

8/5/4
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010735145

WPI Acc No: 1996-232100/199624

XRAM Acc No: C96-073506

Expression vector contg. dicistronic unit encoding foreign protein and fusion protein comprising selection and amplification markers - provides high yields of pure foreign protein e.g. blood coagulation factors

Patent Assignee: IMMUNO AG (IMMO); BAXTER AG (BAXT)

Inventor: DORNER F; FALKNER F; HERLITSCHKA S E; SCHLOKAT U

Number of Countries: 015 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 711835	A1	19960515	EP 95890202	A	19951109	199624 B
CA 2162770	A	19960515	CA 2162770	A	19951114	199637
AT 9402099	A	19970415	AT 942099	A	19941114	199721
AT 403167	B	19971015	AT 942099	A	19941114	199746
US 6114146	A	20000905	US 95557210	A	19951114	200044

Priority Applications (No Type Date): AT 942099 A 19941114

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; EP 294910; WO 9001550; WO 9208796; WO 9303143; WO 9405785; WO 9424870

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 711835	A1	G	61	C12N-015/62	
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL SE					
CA 2162770	A			C12N-015/85	
AT 9402099	A			C12N-015/62	
AT 403167	B			C12N-015/62	Previous Publ. patent AT 9402099
US 6114146	A			C12P-021/02	

Abstract (Basic): EP 711835 A

Expression plasmid contg. a dicistronic transcription and translation unit including a sequence for a foreign protein (A) and a sequence for a fusion protein (B), consisting of at least one selection marker (SM) and at least one amplification marker (AM), is new. Also new are: (1) (B) consisting of highly amplified AM and SM; (3) transfected eukaryotic cells contg. any of the new plasmids; (4) (A) produced by such cells; and (5) use of SK-HEP-1 cells as expression vehicles for prothrombin, factor VIII (or its dB928 mutant), factor IX, protein C, von Willebrand factor and/or serum albumin.

ADVANTAGE - These plasmids provide (A) in high yield and purity, with partic. high content of active protein, even where this requires post-translation modification for activity. They ensure a very high ratio of expressing clones to total clones and surprisingly high initial expression of (A).

Dwg.0/18

Title Terms: EXPRESS; VECTOR; CONTAIN; DI; UNIT; ENCODE; FOREIGN; PROTEIN; FUSE; PROTEIN; COMPRISE; SELECT; AMPLIFY; MARK; HIGH; YIELD; PURE; FOREIGN; PROTEIN; BLOOD; COAGULATE; FACTOR

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/62; C12N-015/85; C12P-021/02

International Patent Class (Additional): A61K-038/16; A61K-038/36;

A61K-038/37; A61K-038/38; A61K-038/43; A61K-038/48; A61K-039/12;

C07K-014/00; C07K-014/005; C07K-014/745; C07K-014/755; C07K-014/765;

BEST AVAILABLE COPY

C12N-005/10; C12N-005/16; C12N-005/22; C12N-009/64; C12N-009/74;
C12N-015/11; C12N-015/65; C12N-015/67
File Segment: CPI



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 0 711 835 A1

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
15.05.1996 Patentblatt 1996/20

(21) Anmeldenummer: 95890202.5

(22) Anmeldetag: 09.11.1995

(51) Int Cl.⁶: C12N 15/62, C12N 15/65,
C12N 15/67, C12N 15/85,
C12N 5/10, C12N 9/64,
C12N 9/74, C07K 14/765,
C07K 14/755, A61K 38/37,
A61K 38/43

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL SE

(30) Priorität: 14.11.1994 AT 2099/94

(71) Anmelder: IMMUNO AG
A-1221 Wien (AT)

(72) Erfinder:
• Herlitschka, Sabine E., Dr. Dipl.-Ing.
A-5020 Salzburg (AT)

• Schlokat, Uwe, Dr.
A-2304 Orth/Donau (AT)
• Falkner, Falko-Günther, Dr.
A-2304 Orth/Donau (AT)
• Dorner, Friedrich, Prof. Dr.
A-1230 Wien (AT)

(74) Vertreter: Pawloy, Peter Michael et al
Patentanwälte
Sonn, Pawloy, Weinzing & Wolfram
Riemergasse 14
A-1010 Wien (AT)

(54) Selektion und Expression von Fremdproteinen mittels eines Selektions-Amplifikations-Systems

(57) Die Erfindung beschreibt ein Expressionsplasmid, das eine dicistronische Transkriptions-/Translations-einheit enthält, welche eine Sequenz für ein Fremdprotein und eine Sequenz für ein Fusionsprotein umfaßt, wobei das Fusionsprotein mindestens einen Selektions- und mindestens einen Amplifikationsmarker enthält.

Weiters ist ein Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Plasmide beschrieben, sowie mit dem erfindungsgemäßen Plasmid transformierte Zelllinien.

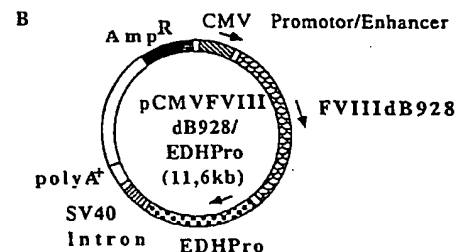
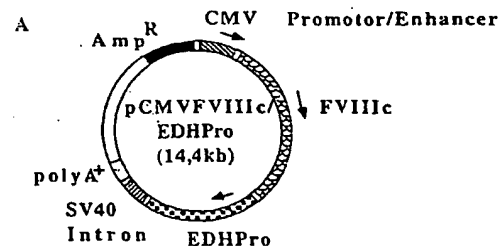


Fig.8

EP 0 711 835 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Expressionsplasmide, die eine dicistronische Transkriptions-/Translationseinheit enthalten.

Die Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellsystemen ist ein gängiges Verfahren in der Biotechnologie geworden. Die meistverwendeten Plasmidvektoren wurden für die effiziente Expression von Fremdproteinen konstruiert und enthalten unter anderem folgende genetische Elemente: einen bakteriellen Replikationsursprung ("Origin of Replication", ori), einen eukaryontischen Promotor für die Transkriptionsinitiation des Fremdgens, eukaryontische mRNA-Prozessierungssignale, Polylinker, welche multiple Restriktions-Endonuclease-Schnittstellen für die Insertion der Fremd-DNA beinhalten, und Selektions- und Amplifikationsmarker für die Selektion und Identifikation von Zellen, die die transfizierte DNA aufgenommen haben.

Der Selektionsmarker vermittelt der Zielzelle die Fähigkeit, in einem gegebenen Medium zu überleben. Dies kann durch Supplementieren einer fehlenden Stoffwechselfunktion geschehen oder durch die Eigenschaft, trotz Präsenz eines toxischen Agens zu wachsen.

Rezessive Resistenzgene können nur in solchen Wirtssystemen verwendet werden, welche hinsichtlich der untersuchten Selektionsaktivität defizient sind. Das Dihydrofolat-Reduktase-Gen (dhfr) ist der am meisten verwendete rezessive Selektionsmarker. Seine effiziente Verwendung ist auf dhfr-defiziente CHO-Zellen beschränkt. Die Dihydrofolat-Reduktase katalysiert die Reduktion von Folat zu Tetrahydrofolat (FH₄). FH₄ seinerseits wird für die Biosynthese von Glycin aus Serin, Thymidin-Monophosphat aus Deoxyuridin-Monophosphat und für die Purin-Biosynthese benötigt. Methotrexat (MTX), ein Folat-Analogon, bindet und inhibiert die Dihydrofolat-Reduktase und bewirkt damit den Zelltod der exponierten Zellen.

Dominante Resistenzgene finden unabhängig vom Genotyp des Wirtssystems Anwendung und sind somit in allen Zellen universell verwendbar. Zu dieser Gruppe zählen unter anderem das Adenosin-Deaminase-Gen (Kaufman et al, J. Biol. Chem. 261:9622, 1986), die Antibiotikaresistenzgene, wie zum Beispiel das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Southern und Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1:327, 1982) und das Hygromycin B Phosphotransferase-Gen (hph; Blochinger and Diggelmann, Mol. Cell. Biol. 4:2929, 1984).

Obwohl hauptsächlich als rezessiver Selektionsmarker in dhfr-defizienten Zellen eingesetzt, gibt es Möglichkeiten, das dhfr-Gen unter bestimmten Voraussetzungen auch in Zellen mit endogener dhfr-Aktivität zu nutzen. Zum Beispiel vermögen transfizierte Zellen durch Verwendung eines starken Promotors für die Transkription des endogenen dhfr-Gens in moderaten Methotrexatkonzentrationen zu wachsen. Die MTX-Konzentration muß in diesem Fall höher sein als die MTX-Konzentration, die von dem endogenen dhfr-Gen kompensiert werden kann. Bei dieser Methode muß man allerdings viele falsch positive Zellklone in Kauf nehmen.

Weiters gibt es die Möglichkeit, ein mutiertes dhfr-Gen als dominanten Selektionsmarker einzusetzen (Simonsen und Levinson, PNAS 80: 2495; 1983, McIvor und Simonsen, NAR 18, 7025 ff., 1990). Diese mutierten dhfr-Gene haben eine deutlich geringere Affinität zu MTX und es ist daher möglich, höhere MTX-Konzentrationen einzusetzen, als notwendig sind, um die endogene Dihydrofolat-Reduktase zu inaktivieren.

Eine andere Möglichkeit stellt die Cotransfektion des dhfr-Gens mit einem zusätzlichen dominanten Selektionsmarker - z.B. dem Neomycin Phosphotransferase-Gen für die Resistenz gegen Geneticin (Southern, supra) -, das anschließende Überführen der Geneticin-resistenten transfizierten Zellen in Methotrexat-haltiges Medium dar (Kim and Wold, Cell 42: 129, 1985). Nach einer Cotransfektion werden allerdings oft falsch positive Klone identifiziert, die nur das dominante Selektionsmarkerplasmid aufgenommen haben.

Durch erhöhten Selektionsdruck kann man eine Amplifikation des Resistenzgens und der angrenzenden Gene beobachten. Das dhfr-Wildtyp-Gen kann mit steigenden MTX-Konzentrationen über viele Runden steigenden Amplifikationsdruckes 1000fach und mehr amplifiziert werden, während amplifizierbare dominante Marker, wie das mutierte dhfr-Gen oder das Adenosin Deaminase-Gen, nur begrenzt, zwei bis drei Schritte, amplifiziert werden können. Durch Hygromycin B-Konzentrationssteigerung konnte bisher keine deutliche Amplifikation beobachtet werden (Wirth und Hauser, "Genetic Engineering of animal cells" in "Genetic Engineering of Animals", Hrsg. Pühler, Verlag Chemie Weinheim, (1993), 1-82; Kaufman, Methods in Enzymology, Bd. 185, (1990), 537-566).

Das System dhfr-Selektion/MTX-Amplifikation stellt daher den am häufigsten verwendeten Ansatz zur Etablierung hoch-exprimierender Zelllinien unter Anwendung der Coexpression heterologer Gene dar.

Auf Grund seiner rezessiven Wirkungsweise wird seine Verwendung jedoch weitgehend auf dhfr-defiziente CHO-Zellen beschränkt.

Erste Ansätze zur Coexpression und Coamplifikation von dhfr und einem Fremdgen wurden durch Cotransfektion von zwei Plasmiden gemacht. Die Plasmide werden dabei in dhfr-defiziente Zellen transfiziert. Eine Cotransfektion bringt allerdings den Nachteil mit sich, daß ein Teil der transfizierten Zellen durch die Selektion nur das dhfr-enhaltende Plasmid und nicht auch das zweite Plasmid aufnimmt.

Eine Verbesserung der Coexpression erreicht man, wenn das Markergen und das Fremdgen auf einem Plasmid angeordnet werden. Mit dieser Methode wurden unter anderem humanes Interferon β (McCormick et al., Mol. Cell Biol. 4:166, 1984), humanes Interferon γ (Haynes und Weissman, Nucl. Acids Res. 11:687, 1983;) und humanes Interleukin

2 (Onomichi, J. Biochem. 102:123, 1987) exprimiert. Die Autoren verwendeten Plasmide, in denen das dhfr-Gen und das Strukturgen jeweils einen eigenen Promotor haben. Als Expressionszelllinie verwenden die Autoren eine dhfr-defiziente Hamsterzelllinie CHO.

Die Abkopplung von der dhfr-defizienten Zelllinie CHO zur Amplifikation und Expression von Fremdproteinen durch Verwendung mutierter dhfr-Gene wurde von Simonsen et al. und McIvor et al. (supra) versucht. Da aber die mutierten dhfr-Gene schon von vornherein wesentlich höhere MTX-Konzentrationen tolerieren, lassen sie sich nicht mehr über so viele Schritte amplifizieren, verglichen mit dem MTX-sensitiven Wildtyp dhfr-Gen.

Ein anderer Weg, um das Spektrum der möglichen Expressionszelllinien zu erweitern, wurde von Walls et al. eingeschlagen (Gene 81:139; 1989). Hier wurden Plasmide verwendet, in denen außer dem rezessiven Amplifikationsmarker dhfr auch der dominante Selektionsmarker Hygromycin B Phosphotransferase vorhanden ist. Die beiden Markergene und das Fremdgen, Protein C, bilden jeweils eine eigene Transkriptionseinheit, wobei jedes dieser Gene unter der Kontrolle eines separaten Promotors steht. In diesem multicistronischen Expressionssystem wird nur ein einziger Klon erhalten, der nach Hygromycin B (Hy B)-Selektion und anschließender dhfr-Amplifikation auch vermehrt rekombinantes Protein C exprimiert. Andere Klone sind zwar auf Hy B selektierbar, nicht aber dhfr-amplifizierbar.

Da alle Systeme, die das Wildtyp dhfr-Gen verwenden, in der Regel auf dhfr-defiziente Zellen beschränkt sind, haben Wernicke und Will (Anal. Biochem. 203:146, 1992) eine Cotransfektion von drei Plasmiden, die jeweils das dhfr-Gen, einen dominanten Marker und das Fremdproteingen enthalten, vorgeschlagen. Sie stellen allerdings fest, daß das Fremdgen (humaner Plasminogen-Aktivator) durch Einsatz von zwei Markern nicht vermehrt exprimiert wird.

Eine weitere Verbesserung des Expressionssystems wird durch eine noch nähere Kopplung der beiden Gene, dhfr und Fremdgen, versucht. Die beiden Gene werden in ein Plasmid unter der Kontrolle von nur einem Promotor gestellt, wobei auf der gebildeten mRNA das Fremdgen gefolgt von dem Markergen als dicistronische RNA zu finden sind.

Gemäß der EP-B1 0 247 145 werden Vektoren beschrieben, in denen entweder ein Markergen und ein Gen für ein beliebiges Fremdprotein oder mindestens zwei Markergene und ein Gen für ein Fremdprotein in eine dicistronische mRNA transkribiert werden. Vergleicht man die Translationseffizienz zweier offener Leserahmen (ORF) in dicistronischen RNAs in solchen Konstrukten, so stellt man fest, daß die Translationsinitiation des stromabwärts gelegenen ORFs um das ca. 100fache ineffizienter verläuft als am stromaufwärts lokalisierten AUG des ersten ORFs (Kaufman et al., EMBO J. 6:187, 1987; Kozak, Mol. Cell. Biol. 7:3438, 1987). Der stromaufwärts liegende ORF bzw. der für die Zelle nicht essentielle ORF (Fremdgen) kann hierbei schnell durch Deletion und DNA-Rearrangements verloren gehen. In den Beispielen der EP-B1 0 247 145 wird auch nur die theoretische Expression eines Fremdgens in CHO-Zellen beschrieben, allerdings fehlen die Expressionsdaten. Durch die Klonierung von einem dominanten Markergen zusätzlich zum dhfr-Gen wurde versucht, das Spektrum der möglichen Expressionszelllinien über die dhfr-defizienten CHO-Zellen hinaus zu erweitern. Die Chance, einen Klon, der alle drei Gene beinhaltet, zu erhalten, ist allerdings auf Grund der oben diskutierten Deletions- und DNA-Rearrangementsphänomene äußerst gering.

Um die Kopplung des Markergens mit dem Fremdprotein beizubehalten, aber andererseits Rearrangements und Deletionen zu reduzieren, wurde versucht, zwischen die dicistronischen Leserahmen Sequenzelemente, an denen Ribosomen intern zu binden vermögen, einzubringen. Diese Sequenzelemente werden "Internal Ribosome Entry Sites" (IRES) genannt, und wurden erstmals in der Familie der Picornaviren gefunden. Die 5'-untranslatierten Regionen (UTR) von Poliovirus (Pelletier and Sonenberg, Nature 334:320, 1988) und Encephalomyocarditis (EMC) Virus (Jang et al., J. Virol. 63:1651; 1989;) sind in der Lage, in Zellen die interne Bindung der Ribosomen und damit verbunden die Translationsinitiation an mRNAs zu vermitteln. Durch Insertion dieser Sequenz zwischen die beiden offenen Leserahmen (Fremdprotein und Selektionsmarker) erreicht man eine gekoppelte, und dadurch effizientere Translation auch des stromabwärts liegenden Leserahmens in der dicistronischen Einheit (Jang, supra) und vermeidet so Rearrangements und Deletionen (Kaufman, Nucl. Acids Res. 19:4485; 1991). In tricistronischen Konstruktionen, in denen dem dritten Cistron die IRES-Sequenz vorgeschaltet ist, wird zumindest der zweite ORF deletiert. Ist hingegen dem zweiten Cistron die IRES vorgeschaltet, so wird der dritte ORF nur mäßig bis gar nicht translatiert. Er unterliegt den Gesetzen, wie sie für dicistronische Konstruktionen ohne IRES gelten (Jang, supra).

Gemäß der DE-A 42 28 458 wird dieses System benutzt, um eine multicistronische Expressionseinheit zu konstruieren, welche die äquimolare Expression der in den jeweiligen Cistrons positionierten Gene erlaubt. Stromabwärts der IRES Sequenz ist eine Nukleotidsequenz 'Y' eingefügt, die die geforderte äquimolare Expression der Fremdgene bewirken soll. Diese Expressionseinheiten sind insbesondere zur Herstellung von rekombinanten Proteinen geeignet, die aus zwei oder mehreren Proteinuntereinheiten bestehen. Als Beispiel für solche rekombinanten Proteine wird das Gen für den "Platelet Derived Growth Factor", der aus einer A- und B-Kette besteht, mit diesem System exprimiert.

Die Verwendung eines Fusionsproteins aus zwei dominanten Selektionsmarkern wird in der WO 92/08796 beschrieben. Hierbei wird ein positiv selektierbares Gen (Hygromycin B-Phosphotransferase, hph) und ein negativ selektierbares Gen (Thymidinkinase des Herpes Simplex Viruses, HSV-1 TK) so fusioniert, daß dem entstehenden Fusionsprotein der C-Terminus des Hygromycin B-Proteins und der N-Terminus des HSV-1 TK-Proteins fehlt. Es wird gezeigt, daß das Fusionsprotein bifunktionell aktiv ist und eine dieses Gen exprimierende Wirtszelle einen dominant

positiv selektierbaren und negativ selektierbaren Phenotyp bekommt.

Ein ebenfalls bifunktionelles Fusionsprotein konstruierten Schwartz et al. (PNAS 88:10416, 1991). Die Autoren fusionierten das HSV-1 TK-Gen mit dem bakteriellen Neomycin-Phosphotransferase (neo)-Gen in der Art, daß das am C-Terminus modifizierte HSV-1 TK-Gen an das Startkodon des neo-Gens im Leserahmen ligiert wurde.

Alle bisher beschriebenen Strategien zur Optimierung der Expression wurden erarbeitet, um Fremdproteine in großem Maßstab herzustellen. Zum Beispiel braucht man zur Herstellung von rekombinanten Impfstoffen eine große Menge gereinigter Proteine. Für die Behandlung von Patienten mit Defekten in der Blutgerinnung ist die Verfügbarkeit von großen Kontingenten an Plasmaproteinen von immenser Bedeutung.

Prothrombin konnte von Jorgensen et al. (J. Biol. Chem. 262: 6729, 1987) in CHO-Zellen ohne Amplifikation in einer Konzentration von 100 ng Prothrombin/10⁶ Zellen in 24 h exprimiert werden. Nach Amplifikation über dhfr waren die Ausbeuten bei 8-11 mU Prothrombin/10⁶-Zellen in 24 h. Durch Expression von Prothrombin mit dem Vaccinia Virus System konnte eine Expression von 18-23 mU/10⁶-Zellen und Tag erreicht werden (Falkner et al., Throm. and Haem. 68:119, 1992).

Die cDNA für den humanen Faktor VIII kodiert für 2332 Aminosäuren. Im Plasma liegt allerdings nur ein Bruchteil von Faktor VIII als einkettiges Protein vor. Die vorherrschende Faktor VIII-Spezies ist ein Zweikettenmolekül, bestehend aus einer leichten und einer unterschiedlich langen schweren Kette. Erste Versuche, rekombinanten Faktor VIII zu exprimieren, stellten sich als schwierig heraus, da die Prozessierung eines so kompliziert aufgebauten Proteins in Wirtszellen sehr ineffizient durchgeführt wird. Kaufman et al. (J. Biol. Chem. 263:6352, 1988) konnten in hoch-amplifizierten CHO-Zellen (20 µM bzw. 1 mM MTX) maximal 1 U FVIIIc/10⁶-Zellen in 24 Stunden exprimieren. Dieser Wert kam nach 10000-facher Expressionssteigerung zustande. Anfangs lag die FVIIIc-Expression nur am Rande der Nachweisgrenze.

Mehrere Ansätze haben dann gezeigt, daß ein rekombinantes Faktor VIII-Protein, dem ein großer Teil der schweren Kette fehlt, ebenfalls koagulative Eigenschaften besitzt, die vom nativen Molekül nicht zu unterscheiden sind (Eaton et al., Biochemistry 25:8343, 1986; Mertens et al., Brit. J. Haematol. 85:133, 1993). Auch in vivo wird dem Faktor VIII durch Prozessierung die B-Domäne abgespalten. Mehrere Autorengruppen konnten sogar zeigen, daß die Expression von B-Domänen-deletiertem Faktor VIII wesentlich besser funktioniert als die Expression der kompletten Faktor VIII cDNA (Toole et al. PNAS 83:5939; 1986; Pittman et al., Blood 81:2925, 1993). Diese Literaturstellen geben 10-20fach höhere Expression von deletiertem FVIII gegenüber FVIIIc an. Diese Expressionswerte konnten jedoch erst nach Amplifikation auf 1 µM bzw. 5 µM MTX und vWF-Coexpression erreicht werden.

Gemäß der US-A 5 171 844 konnte die Faktor VIII-Deletionsmutante FVIIIΔB928 in COS-Zellen transient in einer Konzentration von 15 mU/ml in 48 h Kultur exprimiert werden.

Gemäß der EP-A 0 351 586 wird ein Expressionsplasmid mit einem Faktor VIII, dem die Aminosäuren 740 bis 1649 fehlen, unter der Kontrolle des Hühner β-Actin-Promotors beschrieben. Wird dieses Plasmid mit einem zweiten, dhfr-exprimierenden Plasmid in CHO-Zellen kotransfiziert und anschließend mit 10 nM MTX amplifiziert, kann man die Expression von FVIII:C von ca. 350 mU/10⁶ Zellen pro Tag auf 1300 mU/10⁶ Zellen pro Tag erhöhen. Im Vergleich zu dieser Kotransfektion zeigt die Transfektion mit einem Plasmid, in dem sich sowohl das dhfr-Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors als auch die cDNA des deletierten Faktors VIII unter der Kontrolle des Hühner β-Actin-Promotors befinden, eine weit geringere Initialexpression des Faktors VIII, wie das nicht amplifizierte monocistronische Plasmid.

Der humane Faktor IX wurde in dhfr-defizienten CHO-Zellen mit einem Plasmid exprimiert, welches die Faktor IX-cDNA und das dhfr-Gen unter der Kontrolle des Adenovirus major late-Promotors exprimiert (Kaufman et al., J. Biol. Chem. 261:9622, 1986). Doch selbst bei Amplifikation mit 20 µM MTX wurden bei bis zu 188,0 µg/ml erhaltenem Faktor IX nur 0,2 bis 4,4% funktioneller Faktor IX produziert. Das von Balland et al. beschriebene CHO-Expressionssystem erreicht bei etwa 2 µg Faktor IX/ml und 24 Stunden nur etwa 30% funktionellen Faktor IX (Eur. J. Biochem. 172: 565, 1988). In der WO 86/06408 wird außerdem beschrieben, daß von nicht amplifizierten CHO-Zellen nur 15 ng Faktor IX/ml und 24 Stunden produziert werden.

Protein C wird von Grinell et al. (Adv. Appl. Biotechnol. Series 11:29, 1990) in initialselektierten, nicht amplifizierten Zellklonen in einer maximalen Menge von 1,15 µg/10⁶-Zellen und Tag exprimiert. Gemäß der US 4 775 624 werden 1,8 µg/ml Protein C in CHO DUKX B11-Zellen exprimiert. Auch in der EP-B1 0 266 190 wird eine Protein C-Expression von 1-2 µg/10⁶-Zellen in BHK und 293 Zellen dokumentiert.

Die vorliegende Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, ein System zur Verfügung zu stellen, das eine Expression eines Fremdproteins in hoher Ausbeute und Reinheit ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Expressionsplasmid, das eine dicistronische Transkriptions-/Translationseinheit enthält, welche eine Sequenz für ein Fremdprotein und eine Sequenz für ein Fusionsprotein umfaßt, wobei das Fusionsprotein aus mindestens einem Amplifikationsmarkerprotein und mindestens einem Selektionsmarkerprotein besteht. Die erfindungsgemäßen Expressionsplasmide ermöglichen bei der Expression von Fremdproteinen in dafür geeigneten eukaryontischen Zellen einerseits ein sehr hohes Verhältnis von Fremdprotein exprimierender Klone zu den Gesamtklonen und andererseits eine überraschend hohe Initialexpression der Fremdproteine.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Plasmids umfaßt zusätzlich eine interne Ribosomen-

bindungsstelle, welche eine zuverlässigere Translation der gesamten m-RNA gewährleistet.

Eine besonders bevorzugte interne Ribosomenbindungsstelle ist die 5'-nicht-translatierte Region des Encephalomyocarditis-Virus (ECMV 5'UTR). Diese ermöglicht eine besonders gute Bindung der Ribosomen im internen Bereich der mRNA, wodurch die Translation eines weiter stromabwärts liegenden offenen Leserahmens positiv beeinflusst wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Plasmide liegt die kodierende Sequenz für das Fremdprotein 5' und die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein 3' von der internen Ribosomenbindungsstelle. Diese Anordnung ermöglicht eine maximale Ausbeute an Fremdprotein, da das Gen für das Fremdprotein unmittelbar nach dem Promotor liegt und damit optimal transkribiert wird.

Das Fremdgen und die Sequenz für das Fusionsprotein sind vorzugsweise in eine dicistronische mRNA transkribierbar, weil dadurch die Transkription/Translation in einfachster Weise ablaufen kann.

Die erfindungsgemäßen Expressionsplasmide werden bevorzugt von einem einzigen, möglichst starken Promotor kontrolliert, beispielsweise durch den CMV-, den SV40-, den humanen β -Actin- oder vergleichbare Promotoren.

Zusätzlich können die erfindungsgemäßen Plasmide ein Intron, vorzugsweise das Intron des SV 40 t-Antigens, das 16s/19s-Intron oder das erste Intron des humanen β -Actin-Gens, und/oder ein Polyadenylierungssignal, vorzugsweise das der frühen oder späten Transkriptionseinheit des SV 40-Virus, enthalten. Auch diese Bestandteile ermöglichen optimierte Expressionsraten des Fremdproteins.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Plasmids besteht die Sequenz für das Fusionsprotein aus zwei Teilsequenzen, nämlich einem hochamplifizierbaren Amplifikationsmarkergen, vorzugsweise dem Dihydrofolat Reduktase-Gen, und einem Selektionsmarkergen, vorzugsweise dem Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen.

Das Dihydrofolat Reduktase-Gen/Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen-System hat den besonderen Vorteil, daß dieses Fusionsprotein durch die enge Kopplung der hph- und dhfr-Domänen als dominanter Marker auch in Zellen mit endogenem dhfr-Gen amplifiziert werden kann. Dies wird insbesondere auch durch die Eigenschaft eines hph-Amplifikationspotentials ermöglicht, sodaß man von einem doppelt dominanten selektierbaren und doppelt amplifizierbaren Markerprotein sprechen kann. So kann man zunächst eine genügend hohe hph-Amplifikation durchführen, die bei anschließendem Umschalten auf MTX gewährleistet, daß die dann gewählte MTX-Konzentration nicht mehr vom endogenen DHFR kompensiert werden kann.

Vorzugsweise ist das Selektions-/Amplifikationsmarker-Fusionsprotein bifunktionell und die für das Fusionsprotein kodierende Sequenz so konstruiert, daß der 5'-kodierenden Teilsequenz das Stopkodon und der 3'-kodierenden Teilsequenz gegebenenfalls das Startkodon fehlt. Dadurch kann das Fusionsprotein in einfacher und effizienter Weise translatiert werden.

Bei einer anderen Ausführungsart des Expressionsplasmids sind die kodierenden Sequenzen der beiden Proteinanteile der Sequenz für das Fusionsprotein durch einen Spacer getrennt, insbesondere durch einen 15 Nukleotide langen Spacer. Vorzugsweise kodiert die Spacersequenz für 5 Glycinreste (GGA GGC GGG GGT GGA (SEQ.ID.NO. 2)) oder für 5 Prolinreste und die Sequenz CCA CCC CCG CCT CCA (SEQ.ID.NO. 1).

Das Vorhandensein des Spacerproteins fördert die Funktionalität des Fusionsprotein. Die Aktivität der Markerproteine im Fusionsprotein gegenüber den distinkten Markerproteinen ist nicht verringert.

Die Aminosäuresequenzen von bevorzugten Fusionsproteinen sind als SEQ.ID.NO.3 (Fusionsprotein DHFR/HPH ohne Spacer), SEQ.ID.NO.4 (Fusionsprotein DHFR/HPH mit Glycin-Spacer) und SEQ.ID.NO.5 (Fusionsprotein DHFR/HPH mit Prolin-Spacer) im Sequenzprotokoll aufgelistet.

Beispiele für bevorzugte Plasmide sind die Expressionsplasmide pCMV/EDH-Sp, pCMV/EDHGly und pCMV/EDHPro gemäß Fig.4-A.

Die erfindungsgemäßen Expressionsplasmide eignen sich in besonderer Weise für die Expression von humanen Plasmaproteinen oder viralen Proteinen, bzw. deren Derivate oder Fragmente.

Bevorzugte Proteine, die mit den erfindungsgemäßen Plasmiden exprimiert werden können, sind humanes Prothrombin, humaner Faktor VIII, insbesondere die Deletionsmutante FaktorVIII_{B928} des Faktor VIII, welche die größte Deletion in der B-Domänen aufweist, die noch die Expression eines aktiven Faktor VIII zuläßt, humaner Faktor IX, humanes Protein C, humanes Serumalbumin (HSA) und humaner von Willebrand-Faktor.

Bevorzugte Expressionsplasmide sind

- pCMVFII/EDH-Sp, pCMVFII/EDHGly und pCMVFII/EDHPro (zur Expression von Prothrombin),
- pCMVFVIIIc/EDH-Sp, pCMVFVIIIc/EDHGly und pCMVFVIIIc/EDHPro (zur Expression von Faktor VIII),
- pCMVFVIII_{B928}/EDH-Sp, pCMVFVIII_{B928}/EDHGly, pCMVFVIII_{B928}/EDHPro (zur Expression von FVIII_{B928}),
- pCMV-FIX-EDH-Sp, pCMV-FIX-EDHGly und pCMV-FIX-EDHPro (zur Expression von Faktor IX),
- pCMV-PCwt-EDH-Sp, pCMV-PCwt-EDHPro, pCMV-PCwt-EDHGly, pCMV-PCpt. mut.-EDH-Sp, pCMV-PCpt. mut.-EDHPro und pCMV-PCpt. mut.-EDHGly (zur Expression von Protein C),
- pAct-vWF-EDH-Sp, pAct-vWF-EDHPro und pAct-vWF-EDHGly (zur Expression von von Willebrand-Faktor).

Als besonders vorteilhaft haben sich Expressionsplasmide gezeigt, welche Expressionskassetten umfassen, die die DNA Sequenzen SEQ.ID.NO. 6, SEQ.ID.NO. 7 oder SEQ.ID.NO. 8 enthalten, und eine hervorragende Expression insbesondere des Fremdproteins in der transfizierten Zelle ermöglichen.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Fusionsprotein, welches aus einem hochamplifizierbaren Amplifikationsmarker und einem Selektionsmarker besteht.

Dieses Fusionsprotein ist bevorzugt dadurch gekennzeichnet, daß dem 5'-kodierenden Gen für den Amplifikationsmarker das Stopkodon und dem 3'-kodierenden Gen für den Selektionsmarker das Startkodon fehlt.

Bei einem weiteren bevorzugten Fusionsprotein sind der Amplifikationsmarker und der Selektionsmarker durch ein Spacerprotein getrennt, das vorzugsweise aus mindestens 5 Glycinresten oder aus mindestens 5 Prolinresten besteht.

Beispiele für solche bevorzugten Fusionsproteine weisen die Aminosäuresequenz SEQ.ID.NO. 3, SEQ.ID.NO. 4 oder SEQ.ID.NO. 5 auf.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft transfizierte eukaryontische Zelllinien, vorzugsweise ausgewählt aus den Zelllinien CHO, 293 oder humane Leberzelllinien, wie SK-HEP-1 oder Chang Liver, die mit einem erfindungsgemäßen Expressionsplasmid transfiziert sind und ein Fremdprotein exprimieren.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung setzt man die Zelllinie SK-Hep-1 als Expressionsvehikel, insbesondere für humane Plasmaproteine, wie Prothrombin, Faktor VIII (bzw. Faktor VIII-Derivate, wie die Mutante Faktor VIII dB928), Faktor IX, Protein C oder von Willebrand Faktor, ein.

Vorzugsweise exprimiert die transfizierte eukaryontische Zelllinie humanes Prothrombin, humanen Faktor VIII, die Deletionsmutante dB928 des humanen Faktor VIII, den humanen Faktor IX, das humane Protein C, humanes Serumalbumin (HSA) oder den humanen von Willebrand Faktor, bzw. deren Derivate oder Fragmente.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß eine eukaryontische Zelllinie mit einem erfindungsgemäßen Expressionsplasmid transfiziert wird, die erhaltenen Klone durch einen Selektionsprozeß unter der Kontrolle des Selektionsmarkers isoliert und dabei vorzugsweise gleichzeitig amplifiziert werden, anschließend unter der Kontrolle eines Amplifikationsmarkers weitere Amplifikationen erfolgen, wobei das Fremdprotein exprimiert und geerntet wird.

Bei einer bevorzugten Verfahrensvariante erfolgt der Selektionsprozeß unter Verwendung von Hygromycin B und die weitere Amplifikation unter Verwendung von Methotrexat.

Dabei hat es sich gezeigt, daß einerseits die Kombination der Amplifizierbarkeit und der dominanten Selektierbarkeit des dhfr-Gens sowie die enge Verbindung des Amplifikations-Selektionsmarkerproteinogens mit dem Fremdgen in einer dicistronischen Transkriptions/Translationseinheit für die Ausbeute an Fremdprotein von großer Bedeutung ist.

Beim Optimieren des Expressionsprotokolls unter Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionsplasmide kam es zu dem überraschenden Ergebnis, daß auch das Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen amplifizierbar ist. Dies widerspricht der allgemeinen Auffassung. Durch langsame Steigerung der Hy B-Konzentration konnte unter anderem auch eine Koamplifikation des dhfr-Gens erreicht werden, die eine Umstellung auf eine MTX-Konzentration erlaubte, die für das endogene DHFR bereits toxisch ist. Dann erst wurde mit MTX die eigentliche Amplifikation über mehrere Schritte durchgeführt.

Diese bevorzugte Kombination des rezessiven Amplifikationsmarkers dhfr mit dem dominanten Selektionsmarker hph als Fusionsprotein erlaubt die Amplifikation der Fremdgene bzw. Expression der Fremdproteine in jeder beliebigen Zelllinie. Bevorzugt werden die Zelllinien, die die Prozessierung und Modifikation der Proteine vollständig durchführen.

Als besonders bevorzugte Zelllinien im erfindungsgemäßen Verfahren haben sich CHO, 293 oder humane Leberzelllinien, wie SK-HEP-1n und Chang Liver (ATCC CCL 13) erwiesen.

In den Beispielen werden sowohl die dhfr-defiziente Zelllinie CHO DUKX-B11 (Chasin und Urlaub, PNAS 77:4216, 1980), als auch Zelllinien mit endogenem dhfr-Gen, 293 (ATCC CRL 1573) und SK-HEP-1 (ATCC HTB 52) verwendet.

Erfindungsgemäß eignen sich Leberzelllinien am besten für die Expression des humanen Faktors VIII. Bei Verwendung dieser Zelllinien wurde überraschenderweise festgestellt, daß nicht nur 95% der Faktor VIII transformierten Zellen auch Faktor VIII exprimieren, sondern daß auch initial schon eine große Menge an Faktor VIII exprimiert wird. Nicht zuletzt zeigen diese Leberzelllinien eine optimale post-translationale Modifikation des rekombinanten Faktors VIII.

Insbesondere zeigte sich von allen Leberzelllinien die Zelllinie SK-HEP-1 als besonders gut geeignet.

Erfindungsgemäß werden bevorzugt rekombinante Blutgerinnungsfaktoren, insbesondere rekombinantes humanes Prothrombin, rekombinanter humaner Faktor VIII, rekombinanter humaner FVIII dB928, rekombinanter humaner Faktor IX, rekombinantes humanes Protein C, humanes Serumalbumin (HSA) oder rekombinanter humaner von Willebrand Faktor, hergestellt.

Schließlich betrifft die Erfindung auch Fremdprotein-Präparationen, welche durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind und sich durch einen besonders hohen Anteil an aktivem Protein und hoher Reinheit auszeichnen, insbesondere auch bei Proteinen, die post-translationelle Modifikationsprozesse durchlaufen müssen, um in ihre aktive Form gebracht zu werden.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere Präparationen von viralen Proteinen oder von humanen Plasmaproteinen, vorzugsweise von aktivem humanen Prothrombin, von aktivem humanen Faktor VIII, von aktivem humanen, deletiertem FVIIIIdB928, von aktivem humanen Faktor IX, von aktivem humanen Protein C, von HSA und von aktivem humanen von Willebrand-Faktor.

Die Erfindung betrifft weiters pharmazeutische Zusammensetzungen, welche eine dieser erfindungsgemäßen Präparationen, insbesondere Plasmaproteinpräparationen, umfaßt. Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen werden durch übliche Verfahren aus den erfindungsgemäßen Präparationen erhalten und zeichnen sich durch eine besonders gute Wirksamkeit bzw. Verträglichkeit aus, welche durch das effiziente Herstellungsverfahren der Präparationen bedingt sind.

Durch die erfindungsgemäße Anordnung und Art der funktionellen Segmente (Fremdgen, Markerfusionsproteinen) im Plasmid werden einerseits Deletionen und DNA-Rearrangements verhindert, andererseits aber die Funktionalität beider Markerelemente und auch die mengenmäßig überraschend hohe Expression der diversen Fremdproteine in funktioneller Form gewährleistet. Bei allen untersuchten Fremdproteinen zeigte sich bereits eine sehr hohe Initial-expression. Zum Beispiel wird Prothrombin, wie oben erwähnt, in CHO ohne Amplifikation in einer Menge von 100 ng/10⁶ Zellen in 24h exprimiert (Jorgensen et al., supra). Im nachfolgenden Beispiel 1 wird gezeigt werden, daß mit dem erfindungsgemäßen Expressionsplasmid Prothrombin in CHO-Zellen ohne Amplifikation bereits in einer Menge von 12 bis 15 mU/10⁶ Zellen in 24h (dies entspricht 1,2 bis 1,5 µg), und in 293-Zellen sogar 50 bis 55 mU/10⁶ Zellen in 24h (entspricht 5 bis 5,5 µg) produziert werden konnte. Ebenso können die Expressionswerte, die in der Literatur für andere Plasmaproteine erst nach umfangreicher Amplifikation erreicht werden, mit dem erfindungsgemäßen Expressionsplasmid schon im Stadium der Initialexpression drastisch überschritten werden. Besonders wird darauf hingewiesen, daß die hier angegebenen Expressionsdaten nicht die Menge an exprimiertem, antigenem Protein aufzeigen, sondern daß es sich um Proteinmengen handelt, die in Aktivitätstests ermittelt worden sind.

Die Erfindung wird anhand der Zeichnung sowie der nachstehenden Beispiele, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert. In der Zeichnung zeigen:

Fig. 1 die Anordnung des EDH-Selektions-/Amplifikationsmarkers im Kontext mit Promotor und Fremdgen, wobei der Pfeil die Richtung der Transkription anzeigt;

Fig. 2 die Konstruktion der ED-Kassette und Subklonierung in pCFTM;

Fig. 3 die Struktur der Plasmide pCMVNco/MCS (A) und pCMV/Hy (B);

Fig. 4 die Struktur der Plasmide pCMV/EDH-Sp (A) und pCMVFII/EDH-Sp (B);

Fig. 5A-C die Aminosäuresequenz der Fusionsproteine: DHFR/HPH ohne Spacer (A; SEQ.ID.NO. 3), DHFR/HPH mit Glycin-Spacer (B, SEQ.ID.NO. 4) und DHFR/HPH mit Prolin-Spacer (C, SEQ.ID.NO. 5), wobei die Sequenz im Ein-Buchstabencode angegeben ist;

Fig. 6 die Southern Blot-Analyse von genomischer DNA der CHO-Zellklone #837 (transfiziert mit pCMVFII/EDH-Sp, DHFR Initialexpression) und #4399 (Subklon von #837, amplifiziert auf 40nM MTX);

Fig. 7 die Western Blot-Analyse von 293 bzw. CHO-Zellklonen, die mit dem Plasmid pCMVFII/EDHPro bzw. pCMVFII/EDH-Sp. transfiziert wurden;

Fig. 8 die Struktur der Plasmide pCMVFVIIIc/EDHPro (A) und pCMVFVIIIIdB928/EDHPro (B);

Fig. 9 die Southern Blot-Analyse von genomischer DNA der SK-HEP-1 Zellklone #1963 (400µg HyB/ml) und #3310 (1500µg HyB/ml), wobei der Klon #3310 von #1963 abstammte;

Fig. 10 die Western Blot-Analyse von FVIIIIdB928-exprimierenden 293- und SK-HEP-1-Zellen;

Fig. 11 die Struktur des Plasmides pActvWF/EDHPro;

Fig. 12 die Konstruktion von pCMV-FIX-EDHPro;

Fig. 13 ein Western Blot von rekombinantem Faktor IX aus 293- und SK-HEP-1-Zellklonen im Vergleich zu plasmatischem Faktor IX und rekombinantem Faktor IX aus CHO-Zellen.

Fig. 14 die Konstruktion von pCMV-PCwt-EDHPro und pCMV-PCpt.mut.-EDHPro;

Fig. 15 ein Western Blot von rekombinantem Protein C aus 293 und SK-HEP-1-Zellen im Vergleich zu plasmatischem Protein C;

Fig. 16A-P das Sequenzprotokoll, welches gleichzeitig als Teil der Beschreibung angesehen werden soll;

Fig. 17 die schematische Darstellung des Plasmids pCMVHSA/EDHPro und

Fig. 18 eine Western Blot-Analyse von HSA-exprimierenden SK-HEP-1-Zellen. Die Zahlenwerte am Rand geben das Molekulargewicht in kDa an. Spur 1: SK-HEP-1 Negativkontrolle, Spur 2: SK-HEP-1-Klon #366, Spur 3: SK-HEP-1-Klon #368, Spur 4: SK-HEP-1-Klon #369, Spuren 5-7: plasmatische HSA-Standards, Spur 8: Molekulargewichtsstandard, Spur 9: Pichia p.-Negativkontrolle, Spur 10: HSA exprimierender Pichia p.-Produktionsstamm.

Beispiele:

In den Beispielen wird die Klonierung der Expressionsplasmide beschrieben. Am Beispiel der Expression von Prothrombin werden die Transfektion, das Selektions- und Amplifikationsprotokoll und die dazugehörigen Kontrollexperimente beschrieben. Die Verifikation der dicistronischen mRNA wird mittels Northern Blots durchgeführt, die Amplifikation der Transkriptions-/Translationseinheit wird in Southern Blots überprüft. Für die genaue Analyse der exprimierten Fremdproteine werden Western Blots herangezogen und schließlich werden die rekombinanten Proteine mittels bekannter Koagulationstests auf ihre Aktivität hin überprüft. Die Aktivitäten werden in mUnits (mU) pro 10^6 -Zellen und 24 h angegeben. Um die allgemeine Verwendbarkeit der Expressionsplasmide zu demonstrieren, wird die Expression der Fremdproteine in verschiedenen Zelllinien durchgeführt.

Beispiel 1 beschreibt die Klonierung des humanen Faktors II mit den erfindungsgemäßen Expressionsplasmiden in CHO- und 293-Zellen. Die Klonierung und Expression der Faktor VIII-Deletionsmutante FVIII_{dB928} und des gesamten Faktors VIII wird in 293 und SK-HEP-1-Zellen in den Beispielen 2 und 3 beschrieben. In den weiteren Beispielen 3 bis 6 wird die Expression der humanen Faktoren von Willebrand, Faktor IX, HSA und Protein C in den Zelllinien SK-HEP-1 und 293-Zellen beschrieben. Die Zelllinie SK-HEP-1 wird als Beispiel für eine humane Leberzelllinie verwendet, es können aber auch andere humane Leberzelllinien verwendet werden.

Beispiel 1: Klonierung des Selektions-/Amplifikationsmarkers EMCV5'UTR/dhfr/Hygromycin-Phosphotransferase (EDH) und dessen Anwendung auf die Expression von Faktor II

Konstruktion der Plasmide:

pCMV: Als Ausgangsplasmid wurde pCMV β (MacGregor und Caskey, Nucleic Acids Res. 17: 2365, 1989, Firma Clontech, Palo Alto, USA) verwendet. Dieses wurde mit Noll geschnitten, um das β -Galaktosidase-Gen zu entfernen und anschließend religiert. Daraus entstand das 3,8 kb große Plasmid pCMV.

pCMV-MCS: (MCS; Multiple Klonierungsstelle) Um überflüssige Restriktionsschnittstellen zu entfernen, wurde pCMV mit Sall und HindIII geschnitten, mit dem Klenow Fragment der E. coli DNA Polymerase I (Pol. K.) aufgefüllt und religiert. Aus dieser Reaktion entstand pCMV-MCS. Dieses Plasmid beinhaltet den "Immediate Early Gene"-Promotor/Enhancer des menschlichen CMV und 80bp der 5'UTR des zugehörigen Gens. Es schließt sich 3' eine XhoI-Schnittstelle an, gefolgt von dem SV40 16S/19S-Intron und der SV40-Polyadenylierungsstelle.

pCMVNco/MCS: pCMV-MCS wurde mit XhoI geöffnet und mit den komplementären Oligonucleotiden VI/1: 5'-TCG ACC ATG GAC AAG CTT ATC GAT CCC GGG AAT TCG GTA CCG TCG ACC TGC AGG TGC ACG GGC CCA GAT CTG ACT GAC TGA-3' (SEQ.ID.No. 9) und VI/2: 5'-TCG ATC AGT CAG TCA GAT CTG GGC CCG TGC ACC TGC AGG TCG ACG GTA CCG AAT TCC CGG GAT CGA TAA GCT TGT CCA TGG-3' (SEQ.ID.No. 10) als neue MCS ligiert. Dabei wurde die XhoI-Schnittstelle zerstört und es entstand der Vektor pCMVNco/MCS (Fig. 3-A). Die neue MCS verfügte über eine NcoI-Erkennungssequenz als Translations-Initiations-Codon um Fremdgene ohne eigenes ATG-Startcodon einsetzen und exprimieren zu können.

pCMV/Hy: In pCMVNco/MCS wurde das Hygromycin β -Phosphotransferase-(hph)-Gen ohne ATG (hph-ATG) eingesetzt. hph-ATG wurde als 1,2 kb-Fragment aus dem von Boehringer Mannheim erhältlichen Vektor pHphO als Sall, SmaI-Fragment isoliert und in die Sall- und Pol. K.-behandelte ApaLI-Schnittstellen von pCMVNco/MCS eingesetzt. Somit entstand pCMV/Hy (Fig. 3-B).

pSVDHFR: Das dhfr-Fragment samt Polyadenylierungs-Sequenz wurde als 1500bp großes PstI-Fragment aus pASDII (Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol. 2: 1304, 1982) isoliert und über die PstI-Schnittstelle in pSVMCS eingesetzt. pSVMCS entstand aus pSV β (MacGregor und Caskey, supra, Firma Clontech, Palo Alto, USA), indem das β -

Galaktosidase-Gen durch Schneiden mit NotI und Religation des verbleibenden Vektors entfernt wurde. Durch Schneiden mit XbaI und HindIII, Auffüllen mit Pol.K und Religation wurde die MCS 3' der SV40-Polyadenylierungssequenz entfernt. In die NotI-Schnittstelle wurde dann eine neue MCS eingesetzt. Die eingesetzte MCS hatte folgende Sequenz: 5'-GG CCT AGG GCC CTA GGC CTA CTA GTA CTA AGC TTC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAC CCC GGG GAA TTC AAT CGA TGG CC-3' (SEQ.ID.No. 11).

pTAE(-TAA) (Fig. 2): In den Vektor pCRTTM (Firma Invitrogen, San Diego, USA) wurde die Kasette bestehend aus dem 5' nichttranslatierten Bereich des Encephalomyocarditis Virus (EMCV5'UTR) und dem dhfr-Fragment ohne Stop-Codon TAA (-TAA) subkloniert. Die Herstellung des EMCV5'UTR/dhfr(-TAA)-Fragments erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das 500bp große EMCV5'UTR-Fragment wurde aus pTKemc-PT2 (WO 91/11519) durch PCR mit den Primern #640, 5'-ACC CCC GGG GGT ACC ATA TTG CCG TCT TTT GG-3' (SEQ.ID.No. 12) und #642, 5'-GGA ATT CCC ATG GTA TTA TCG TGT TTT TC-3' (SEQ.ID.No. 13) isoliert.

Das 560bp große dhfr-Fragment wurde aus pSVDHFR mittels PCR mit den Primern #634, 5'-GGA AGC TTG GCC ATG GTT CGA CCA TTG AAC TGC-3' (SEQ.ID.No. 14) und #698, 5'-GGT CAA GCT TTT CTT CTC GTA GAC TTC AAA CTT ATA CT-3' (SEQ.ID.No. 15) isoliert.

Die durch PCR-Amplifikation gewonnenen EMCV5'UTR- und dhfr-Fragmente wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung aus "Low Melting Point Agarose" (LMA) isoliert. Die beiden Fragmente wurden jeweils mit NcoI nachgeschnitten und ligiert. Von dem Ligationsprodukt wurde neuerlich eine PCR-Amplifikation mit den flankierenden Primern angesetzt, also mit den Primern #640 und #698 (siehe oben). Das resultierende 1050bp große Fragment wurde in den Vektor pCRTTM (Firma Invitrogen, San Diego, USA) eingesetzt. Dabei entstand das Plasmid pTAE(-TAA).

pCMV/EDH-Sp: In den mit SmaI und SalI geöffneten Vektor pCMV/Hy wurde das SmaI-, SalI-Fragment EMCV5'UTR/dhfr(-TAA) aus pTAE(-TAA) eingesetzt. Dabei entstand das Konstrukt pCMV/EDH-Sp (Fig. 4 A).

pCMV/EDHGly: In die singuläre SalI-Schnittstelle zwischen dhfr- und hph-Gen wurde ein "Spacer" eingesetzt. Der Spacer bestand aus den komplementären Oligonucleotiden #1077 (5'-TCG ATT ACG TAC TGG AGG CGG GGG TGG AAA-3'; SEQ.ID.No. 16) und #1078 (5'-TCG ATT TCC ACC CCC GCC TCC AGT ACG TAA-3'; SEQ.ID.No. 17), verfügte über eine neue SnaBI-Schnittstelle und kodierte für fünf Glycin-Reste. Der Übergang zwischen dhfr und hph hatte somit die Sequenz: 5'-GT CGA TTA CGT ACT GGA GGC GGG GGT GGA AAT CGA CGG ATC CC-3' (SEQ.ID.No. 18).

pCMV/EDHPro: In die singuläre SalI-Schnittstelle zwischen dhfr- und hph-Gen wurde der "Spacer" von pCMV/EDHGly in reverser Orientierung eingesetzt. Somit kodierte er hier für fünf Prolin-Reste, wobei der Übergang zwischen dhfr und hph die folgende Sequenz hatte: 5'-GT CGA TTT CCA CCC CCG CCT CCA GTA CGT AAT CGA CGG ATC CC-3' (SEQ.ID.No. 19).

pCMVFII/EDH-Sp (Fig. 4 B): Die Faktor II-cDNA wurde als 2 kb-Fragment aus pTKemc-PT2 (WO 91/11519) isoliert, indem mit NcoI partial und SmaI vollständig geschnitten wurde. Dieses Fragment wurde in den Vektor pCMV/EDH-Sp eingesetzt, welcher ebenfalls NcoI partial und SmaI vollständig geschnitten wurde.

pCMVFII/EDHGly: Die Faktor II-cDNA wurde als 2 kb-Fragment aus pTKemc-PT2 (WO 91/11519) isoliert, indem mit NcoI partial und SmaI vollständig geschnitten wurde. Dieses Fragment wurde in den Vektor pCMV/EDHGly eingesetzt, welcher ebenfalls NcoI partial und SmaI vollständig geschnitten wurde.

pCMVFII/EDHPro: Die Faktor II-cDNA wurde als 2 kb-Fragment aus pTKemc-PT2 (WO 91/11519) isoliert, indem mit NcoI partial und SmaI vollständig geschnitten wurde. Dieses Fragment wurde in den Vektor pCMV/EDHPro eingesetzt, welcher ebenfalls NcoI partial und SmaI vollständig geschnitten wurde.

Herstellung der permanenten Zelllinien:

Initialexektion: CHO-(ATCC CRL 9096) und 293-Zellen (ATCC CRL 1573) wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD) bezogen. Beide Zelllinien wurden mit den Konstrukten pCMVFII/EDH-Sp, pCMVFII/EDHGly und pCMVFII/EDHPro entsprechend Graham and von der Eb, Virology 52: 456, 1973 transfiziert. CHO-Zellen wurden der DHFR-Selektion, der Hygromycin B-Selektion und der gleichzeitigen Hygromycin B- (HyB) und DHFR-Selektion unterzogen. 293-Zellen wurden der Hygromycin B-Selektion ausgesetzt. Nach 10-20 Tagen wurden die resistenten Kolonien vereinzelt und auf Faktor II (FII)-Expression getestet.

DHFR-Selektionsmedium: DMEM/HAMs F12 ohne Glycin Thymidin und Hypoxanthin, 10% dialysiertes fötales Kälberserum, 10IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (Gibco 043-05140H), L-Glutamin (Gibco 043-05030H).

Hygromycin B-Selektionsmedium: DMEM/HAMs F12, 10% fötales Kälberserum, 10IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin (Gibco 043-05140H), L-Glutamin (Gibco 043-05030H), je 10µg/ml Adenosin, Thymidin und Deoxyadenosin (Sigma), 200µg Hygromycin B (Calbiochem)/ml.

Genamplifikation: Die Amplifikation via hph erfolgte mittels Hygromycin B (HyB) beginnend bei 200µg HyB/ml. Um die Möglichkeit von Rearrangements oder Deletionen durch zu hohe Konzentrationen von HyB gering zu halten, wurde die HyB-Konzentration je Amplifikationsschritt jeweils nur verdoppelt. Die Amplifikation mittels DHFR bei CHO-Zellen erfolgte beginnend bei 10nM Methotrexat (MTX) durch Verdopplung der MTX-Konzentration je Stufe. Die Amplifikation von 293 Zellen wurde beginnend bei 100nM MTX angesetzt. Die bei jeder Amplifikationsstufe entstehenden resistenten

Zellklone wurden vereinzelt und auf Faktor II-Expression untersucht.

Bestimmung der Faktor II-Aktivität: Die zu testenden Faktor II-exprimierenden Zellklone wurden mit serumfreiem Testmedium, supplementiert mit 5µg/ml Vitamin K1 24 Stunden inkubiert. Die Bestimmung der Gerinnungsaktivität erfolgte mit einem Koagulometer KC4A (Firma Amelung GmbH, BRD) nach einer modifizierten Prothrombin-Zeit-Methode (Falkner et al. 1992).

Proteinnachweis mittels Western Blot-Analysen: Western Blots wurden entsprechend Towbin et al., PNAS 76: 4350, 1979 vorgenommen. Als erster Antikörper wurde ein Anti-Prothrombin-Antikörper (Firma Dakopatts, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde ein Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper (Firma BioRad, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:7500 verwendet, welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Der Nachweis mittels Färbung erfolgte nach Standardmethoden mit dem Protoblot-System der Fa. Promega.

Untersuchungen der DNA- und RNA-Struktur: Die Präparation der zellulären DNA erfolgte nach Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36: 32, 1973, Southern Blot-Analysen nach Southern, (J. Mol. Biol. 98: 503, 1975) bzw. nach Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. Die für die Spaltung der zellulären DNA notwendigen Restriktionsenzyme wurden von Boehringer Mannheim, BRD bezogen. Die Hybridisierungssonden Faktor II, dhfr und hph wurden aus den Plasmiden pCMVfII/EDHPro, pSVDHFR und pCMV/Hy präpariert.

Die Isolierung der mRNA erfolgte mit den Materialien und nach den Protokollen der Firma Invitrogen, USA ("Fast Track", #1-800-955-6288), Northern Blot-Analysen wurden entsprechend Sambrook et al., supra, durchgeführt. RT-PCR Analysen erfolgten mit den Materialien der Firma Perkin Elmer Cetus, USA ("rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kit", #N808-0069) nach Kwok, PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, CA 1990 bzw. Myers et al., Biochemistry 30: 7661, 1991, wobei je Reaktion 2µg mRNA eingesetzt wurden. Als Primer wurden #1489 (bindet 3' in der Faktor II-cDNA): 5' GGA AAT ATG GCT TCT ACA CAC ATG TGT TCC GCC TGA A 3' (SEQ.ID.No. 20) und #1490 (bindet 5' im dhfr-Gen): 5' TCC GTT CTT GCC AAT CCC CAT ATT TTG GGA CAC GGC G 3' (SEQ.ID.No. 21) eingesetzt.

Konstruktion des Selektions-/Amplifikationsmarkers EMCV5'UTR/dhfr/Hygromycin Phosphotransferase (EDH): Das CHO-Zellexpressionssystem ist in seiner üblichsten Ausführung mit DHFR-Selektion bzw. Methotrexat (MTX)-Amplifikation verbunden und an die Verfügbarkeit von DHFR-defizienten Zelllinien wie CHO DUKX B11 (Urlaub und Chasin, supra) gebunden. Da sich CHO-Zellen jedoch nicht bedingungslos für die Expression jedes beliebigen Proteins eignen, wurde der Versuch unternommen, auch andere Zelllinien als Expressionssysteme effizient nutzbar zu machen. In diesem Sinne wurde der EDH-Marker konstruiert. Er findet seine Hauptanwendung in solchen Zellen, die über ein endogen funktionelles dhfr-Gen verfügen, da in derartigen Zelllinien die Selektion bzw. Genamplifikation durch DHFR bzw. MTX nur unzureichend durchführbar ist.

Bei diesem EDH-Marker handelte es sich um ein bifunktionelles Fusionsprotein, welches sich aus dem Dihydrofolat Reduktase (dhfr)-Gen und dem Hygromycin Phosphotransferase (hph)-Gen zusammensetzt. Das hph-Gen wurde gewählt, weil es einen sehr guten Selektionsmarker darstellt, das dhfr-Gen deshalb, weil es den besten Amplifikationsmarker darstellt.

Da nicht auszuschließen war, daß sich die beiden fusionierten enzymatischen Proteineinheiten durch ihre räumliche Nähe in ihrer Aktivität beeinflussen oder sogar behindern könnten, wurde versucht, dies dadurch zu verhindern, daß zwischen die beiden Fusionsprotein-Anteile ein sogenannter "Spacer" eingesetzt wurde. Bei diesem Spacer handelte es sich um ein kurzes Oligonucleotid, welches in der einen Orientierung eingesetzt für fünf Glycin-Reste ("Glycin-Spacer", Gly) in der reversen Orientierung für fünf Prolin-Reste ("Prolin-Spacer", Pro) codierte. Mit der gewählten Anordnung von dem zu exprimierenden Fremdgen und Fusionsmarkergen sollte eine dicistronische RNA gebildet werden können. Dies wurde erreicht, indem an das 5'-Ende des Fusionsmarkers auf DNA-Ebene eine Sequenz eingesetzt wurde, die als "internal ribosome entry site" (IRES) fungierte. Hier kam die IRES des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) zur Anwendung. Sie befindet sich im 5'-nicht-translatierten Bereich (5'UTR) des EMCV und wird deshalb EMCV5'UTR genannt. Die resultierende Gen-Kassette, bestehend aus EMCV5'UTR/dhfr/hph (EDH), wurde 3' des zu exprimierenden Fremdgens angeordnet, sodaß sich die in Fig. 1 dargestellte Konfiguration von Promotor, Fremdgen und EDH-Kassette ergab.

Für das Fusionsprotein des EDH-Selektions-/Amplifikationsmarkers wurde die EMCV5'UTR/dhfr (ED)-Kassette via PCR kloniert. Das EMCV5'UTR-Fragment wurde aus dem Plasmid pTKemc-PT2 (WO 91/11519), das dhfr-Fragment (ohne Stop Codon TAA) aus dem Plasmid pSVDHFR mittels PCR isoliert, die beiden Amplifikationsprodukte mit NcoI nachgeschnitten, ligiert und das Ligationsprodukt neuerlich mittels PCR amplifiziert und in der Folge in den Vektor pCRTM (Firma Invitrogen, San Diego, USA) subkloniert. Das Konstruktionsschema ist in Fig. 2 dargestellt. Aus dem resultierenden Plasmid pTA/ED (-TAA) wurde die Kassette EMCV5'UTR/dhfr (-TAA) isoliert und in das Plasmid pCMV/Hy (Fig. 3-B) eingesetzt. Das Plasmid pCMV/Hy verfügte bereits über das Hygromycin Phosphotransferase-Gen (aus pHphO, Boehringer Mannheim, BRD) ohne Start-Codon (hph-ATG). Durch diese Vorgangsweise entstand die 2,2 kb umfassende Genkassette EDH in Form des Konstruktes pCMV/EDH-Sp (Fig. 4-A). In diesem Plasmid lag das dhfr-Gen in unmittelbarer Fusion mit dem hph-Gen vor. Um eine potentielle Behinderung der beiden Komponenten

DHFR und Hygromycin Phosphotransferase (HPH) auf Proteinebene zu verhindern, wurde zwischen die beiden Gene ein kurzes Oligonucleotid als "Spacer" eingesetzt. Somit entstanden die drei Varianten des Selektions-/Amplifikationsmarkers EDH-Sp, EDHGly und EDHPro. In Fig. 4-A ist repräsentativ das Expressionsplasmid pCMV/EDH-Sp dargestellt, die beiden anderen Expressionsplasmide wurden als pCMV/EDHGly bzw. pCMV/EDHPro bezeichnet.

In diese drei Ausgangsvektoren wurde als "gene of interest" die Faktor II-cDNA als 2 kb umfassendes NcoI-SmaI-Fragment aus pTKemc-PT2 (WO 91/11519) eingefügt, wodurch die Expressionsplasmide pCMVFII/EDH-Sp, pCMVFII/EDHGly und pCMVFII/EDHPro entstanden. Repräsentativ ist pCMVFII/EDH-Sp in Fig. 4-B gezeigt.

Die Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine DHFR/HPH-Sp, DHFR/HPHGly und DHFR/HPHPro sind in Fig. 5-A, B und C dargestellt.

Untersuchung der funktionellen Eigenschaften des EDH-Selektions-/Amplifikationsmarkers in transfizierten Zellen: Die drei Konstrukte pCMVFII/EDH-Sp, pCMVFII/EDHGly und pCMVFII/EDHPro wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften zur Selektion und Amplifikation untersucht. Zu diesem Zweck wurden sie in CHO- und 293-Zellen transfiziert. In DHFR-defizienten CHO-Zellen (Urlaub and Chasin, 1980) wurde das getrennte und das gleichzeitige Funktionieren der beiden Fusionsprotein-Komponenten DHFR und HPH getestet. Die transfizierten 293-Zellen, als Repräsentanten einer DHFR positiven Zelllinie wurden hinsichtlich der Funktion der HPH-Komponente untersucht, indem sie mit dem Antibiotikum Hygromycin B (HyB) selektiert wurden. Die Ergebnisse der DHFR- und HPH-Initialexektion sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

	CHO-Zellen/EDH-System	CHO-Cotransfektion (Jorgensen et al., 1987)	293-Zellen
	mUnits (µg)/10 ⁶ -Zellen	mUnits (µg)/10 ⁶ -Zellen	mUnits (µg)/10 ⁶ -Zellen
Initialexektion	12-15 (1,2-1,5)	(0,1)	50-55 (5-5,5)
Amplifikation	/	/	/
100nM MTX	/	/	100-150 (10-15)
150nM MTX	150-160 (15-16)	/	/
1000nM MTX	/	8-11 (1,3-1,6)	/

Sie zeigen, daß CHO-Zellen initial zwischen 12-15mU Faktor II/10⁶-Zellen und 24 Stunden exprimieren, mit 293-Zellen ließen sich Werte bis zu 55mU Faktor II/10⁶-Zellen und 24 Stunden nachweisen. Das erfindungsgemäße Expressionssystem zeigt also in CHO-Zellen nach initialer Selektion eine unerwartet hohe Expression an Faktor II. Diese hohe Expression von Faktor II konnte allerdings bei Verwendung der Zelllinie 293 noch weiter gesteigert werden.

Die aus der Initialexektion resultierenden Zellklone wurden auf das Amplifikationsvermögen der DHFR- und HPH-Komponente des EDH-Markers untersucht. Die Ergebnisse daraus sind ebenfalls in Tabelle 1 zusammengefaßt. Auch hier ließ sich zeigen, daß bereits bei 100nM MTX mit 293 Zellen gleichviel Faktor II exprimiert wird verglichen mit CHO-Zellen, die auf 150nM MTX wuchsen.

Die Bildung dicistronischer RNA und das Funktionieren des EDH-Markers wurde anhand der Expression von Faktor II untersucht. Die initial selektierten transfizierten CHO- und 293-Zellklone zeigten in der Northern Blot-Analyse und in der RT (Reverse Transkriptase)-PCR das Vorhandensein dicistronischer RNAs.

Sowohl die initial selektierten als auch die amplifizierten CHO- und 293-Zellklone wurden mittels Southern Blot-Analyse auf ihre genomische Struktur untersucht. Die initialselektierten Zellklone zeigten eine Kopienanzahl, die im Bereich von 1-5 Genkopien/Zelle lag. Im Rahmen der Amplifikation über die HPH Komponente des EDH-Markers konnte ausgehend von 200µg HyB/ml bis auf 3000µg HyB/ml eine leichte Genamplifikation festgestellt werden (siehe auch Beispiel 2).

Die Amplifikation über die DHFR-Komponente des EDH-Markers wurde untersucht, indem transfizierte CHO-Zellen ausgehend von 10nM MTX einer sukzessive steigenden MTX-Konzentration bis 40nM ausgesetzt wurden. Trotz dieser sehr geringen Anhebung der MTX-Konzentration konnte bereits klar Genamplifikation nachgewiesen werden (Fig. 6). Dies wird deutlich, wenn die Signalintensitäten des DHFR initial selektierten CHO-Klones #837 mit denen des daraus hervorgegangenen, auf 40nM MTX-amplifizierten CHO-Klones #4399 verglichen werden. Dieser Effekt läßt sich sowohl bei Hybridisierung mit einer Faktor II-spezifischen Sonde (#837 in Spur 2 und #4399 in Spur 3) als auch mit einer hph (#837 in Spur 6 und #4399 in Spur 7) und dhfr (#837 in Spur 10 und #4399 in Spur 11) spezifischen Sonde nachweisen. Die Spuren 1, 5 und 9 stellen jeweils die Negativkontrollen aus nicht transfizierten CHO-Zellen dar. In den Spuren 4, 8 und 12 wurde das Referenzplasmid pCMVFII/EDHGly aufgetragen.

Der Effekt der Genamplifikation über die DHFR-Komponente des EDH-Markers konnte in gleicher Weise sowohl in initial DHFR-selektierten CHO-Zellen (Fig. 6), als auch in initial HyB-selektierten Zellen festgestellt werden.

Expression von Faktor II: Die Identität des exprimierten Faktor II mit seinem plasmatischen Analogon wurde im

Rahmen von Western Blot-Analysen bestätigt (Fig. 7). Die Zahlenwerte am Rand geben die Molekulargewichte in kDa an. Die Faktor II-spezifische Bande ist mit einem Pfeil markiert.

Mit den vorgenommenen Amplifikationen ging auch eine Erhöhung der Faktor II-Expression einher. Anfangs betrug die Expression von Faktor II in CHO-Zellen 12-15mU/10⁶-Zellen und 24 h (entspricht mindestens 1,2-1,5µg Faktor II/10⁶-Zellen und 24 h). Mit dem hier beschriebenen System konnte also eine Steigerung von zumindest einem Faktor von 10 gegenüber der Literatur erreicht werden. Mit 293-Zellen wurden Initial-Werte von 50-55mU (entspricht mindestens 5-5,5µg Faktor II)/10⁶-Zellen und 24 h erzielt, wobei 293-Zellen wiederholt in dieser Größenordnung signifikant mehr Faktor II exprimierten als CHO-Zellen.

Die Amplifikation in CHO-Zellen ergab bei 150nM Methotrexat (MTX) Expressionen im Bereich von 150-160mU (entspricht mindestens 15-16 µg Faktor II)/10⁶-Zellen und 24 h. Trotz dieses relativ geringen Amplifikationsniveaus konnten also im Vergleich mit der Literatur deutlich höhere Werte erreicht werden. Bei den hier beschriebenen Angaben von mindestens 15-16µg Faktor II bei 150nM MTX handelte es sich bereits um Aktivitätswerte, sodaß die Expressionssteigerung mit dem hier beschriebenen System beträchtlich war. Bei der von Jorgensen beschriebenen Methodik wurde trotz Amplifikation in einer sieben Mal höheren MTX-Konzentration nur ein Zehntel der erfindungsgemäßen Expressionswerte erreicht. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, daß ausgehend von 150nM MTX noch ein großes MTX-Amplifikationspotential offen ist.

Die Expressionswerte, die in CHO- und 293-Zellen mit dem hier beschriebenen EDH-Marker Expressionssystem und dem konventionellen System der CHO-Cotransfektion (Jorgensen et al., supra) erreichbar waren, sind vergleichend in Tabelle 1 dargestellt.

Beispiel 2: Expression von komplettem Faktor VIII (FVIIIc) und der Deletionsmutante FVIII_{B928} in transformierten in 293- und SK-HEP-1-Zellen

Konstruktion der Plasmide:

pCMVFVIIIc/EDHPro (Fig. 8-A): Die volle Länge Faktor VIII-cDNA wurde von Leyte et al., Biochem. J. 263: 187, 1989 konstruiert. Die 7,2 kb umfassende Faktor VIII-cDNA wurde als Fragment mit glatten Enden in die SmaI-Schnittstelle von pCMV/EDHPro (siehe Beispiel 1) eingesetzt. Daraus resultierte das Expressionsplasmid pCMVFVIIIc/EDHPro.

pCMVFVIII_{B928}/EDHPro (Fig. 8-B): Die Deletion der Faktor VIII B-Domäne ist bei Leyte et al., J. Biol. Chem. 266: 740, 1991 beschrieben. Die 4,4 kb umfassende FVIII_{B928}-cDNA wurde als Fragment mit glatten Enden in die SmaI-Schnittstelle von pCMV/EDHPro (siehe Beispiel 1) eingesetzt.

Herstellung der permanenten Zelllinien: Initialexektion: 293-Zellen (ATCC CRL 1573) wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen, mit den Konstrukten pCMVFVIII_{B928}/EDHPro bzw. pCMVFVIIIc/EDHPro nach Graham and van der Eb, supra transfiziert und der HyB-Selektion unterzogen (siehe Beispiel 1). Nach 10-20 Tagen wurden die resistenten Kolonien vereinzelt und auf Faktor VIII-Expression getestet.

SK-HEP-1-Zellen (ATCC HTB 52) wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) bezogen und mit den Konstrukten pCMVFVIII_{B928}/EDHPro bzw. pCMVFVIIIc/EDHPro transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach Neumann et al., EMBO J. 1:841, 1982 in modifizierter Form. Dabei wurden 1-3x10⁷-Zellen für einen Elektroporationsansatz eingesetzt, wobei der Puls mittels eines BioRad Gene PulserTM (Firma BioRad, CA, USA) bei 1000V, 25µF, 200 Ohm durchgeführt wurde. Anschließend an den Puls wurden die Zellen in Medium aufgenommen und 48 Stunden nach dem Puls in HyB-Selektionsmedium (siehe Beispiel 1) überführt. Nach 10-20 Tagen wurden die resistenten Kolonien vereinzelt und auf Faktor VIII-Expression getestet.

Genamplifikation: Die Amplifikation mittels Hygromycin B (HyB) erfolgte beginnend bei 200µg HyB/ml durch Verdopplung der HyB-Konzentration je Stufe (siehe Beispiel 1). Die Amplifikation mittels DHFR bei 293 und SK-HEP-1-Zellen erfolgte beginnend bei 100nM Methotrexat (MTX) durch Verdopplung der MTX-Konzentration je Stufe. Die bei jeder Amplifikationsstufe entstehenden resistenten Zellklone wurden vereinzelt und auf Faktor VIII-Expression untersucht.

Aktivitätsbestimmung von Faktor VIII: Sämtliche Aktivitätstests erfolgten mit den Materialien ("COATTEST VIII: C/4") und nach dem Protokoll der Firma Chromogenix AB, Schweden bzw. mit dem "Immunochrom FVIII:C" Kit der Firma Immuno, Österreich.

Proteinnachweis mittels Western Blot-Analysen: Western Blots wurden entsprechend Towbin et al., (supra) vorgenommen. Als erster Antikörper wurde eine Mischung der monoklonalen Anti-Faktor VIII-Antikörper CLB Cag A, CLB Cag 9 und CLB Cag 117 (alle drei Stel et al., Blood 63: 1408, 1983) verwendet. Als zweiter Antikörper wurde ein Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Firma BioRad, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:7500 verwendet, welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Der Nachweis mittels Färbung erfolgte nach Standardmethoden mit dem Protoblot-System der Firma Promega.

Untersuchungen der DNA und RNA Struktur: Die Präparationen von DNA und RNA erfolgten wie bei Beispiel 1

beschrieben. Zur Hybridisierung im Rahmen der Southern Blot-Analysen bzw. Northern Blot-Analysen wurden Faktor VIII-, dhfr- und hph-Fragmente aus den jeweiligen Plasmiden isoliert (also aus pCMVFVIIIc/EDHPro, pSVDHFR und pCMV/Hy).

Für die Expression von Faktor VIII wurden bisher besonders CHO-Zellen untersucht (Kaufman et al., J. Biol. Chem. 263: 6352, 1988; Pittman et al., Blood 81: 2925, 1993). Die DHFR-defizienten CHO-Zellen waren zwar insofern interessant, als sie sich leicht über DHFR selektieren bzw. mit MTX hoch amplifizieren lassen. Der entscheidende Nachteil im Rahmen der Nutzung von CHO-Zellen bestand jedoch darin, daß sie nur außerordentlich geringe Mengen an Faktor VIII exprimierten, vor allem nach initialer Selektion konnte kein Faktor VIII nachgewiesen werden. Die Isolierung von Faktor VIII exprimierenden CHO-Zelllinien erfordert also hohe Amplifikation. Dies ist mit sehr hohem "Screening"-Aufwand verbunden, da die Amplifikation "blind", das heißt ohne vorherigem Testen von initial selektierten Zellklonen ablaufen muß. Zudem erwies es sich als schwierig, stabil Fremdprotein-exprimierende CHO-Zelllinien zu etablieren, da es häufig zum Auftreten von "double minute" Chromosomen kommt (Schimke et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45, 1981; Kaufman et al., Mol. Cell. Biol. 3: 699, 1983). Auch aus diesem Grund kann stabile Fremdprotein-Expression mit dem CHO-Zellsystem nur durch häufiges und aufwendiges Subklonieren der untersuchten Zellklone erreicht werden, was jedoch umso aufwendiger wird, je höher die jeweiligen Zellklone amplifiziert werden.

Aus diesen Gründen sollten außer CHO-Zellen, andere, DHFR-positive Zelllinien auf ihr Faktor VIII-Expressionsvermögen untersucht werden. Präferenziell sollten dabei humane Zelllinien verwendet werden, um mögliche Spezies-abhängige Änderungen der notwendigen posttranslationalen Modifikationen auszuschließen. Um diese DHFR-positiven Zelllinien einerseits effizient selektieren zu können und andererseits via dhfr amplifizieren zu können, wurde der EDHPro-Selektions-/Amplifikationsmarker eingesetzt. Als Zelllinien wurden vergleichend 293 und SK-HEP-1-Zellen herangezogen. Nachdem Faktor VIII endogen zum Teil in der Leber synthetisiert wird, wurden stellvertretend für humane Leberzellen SK-HEP-1-Zellen verwendet.

Über die Zelllinie SK-HEP-1 als Expressionsvehikel gibt es bisher in der Literatur keine Hinweise. Die Zelllinie 293 wurde bereits für die Expression von Protein C verwendet (Walls et al., 1989) und hatte sich für die Expression von Faktor II bewährt (siehe Beispiel 1). Beide Zelllinien wurden jedoch noch nicht für die Expression von Faktor VIII untersucht bzw. beschrieben.

Obwohl zwar auch die komplette Faktor VIII-cDNA (FVIIIc) herangezogen wurde, lag der Schwerpunkt auf der Expression einer Faktor VIII-Mutante (FVIII_{dB928}), welche die gesamte B-Domäne deletiert hatte (Leyte et al., J. Biol. Chem. 266: 740, 1991).

Die Konstruktion des EDH-Selektions-/Amplifikationsmarkers erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Expressionsplasmid pCMVFVIIIc/EDHPro (Fig. 8-A) entstand, indem die vollständige Faktor VIII-cDNA als Fragment mit glatten Enden in pCMV/EDHPro eingesetzt wurde.

Analog entstand pCMVFVIII_{dB928}/EDHPro.

Herstellung und Analyse der pCMVFVIII/EDHPro-transfizierten Zelllinien: Die Zelllinien 293 bzw. SK-HEP-1 wurden mit den Konstrukten pCMVFVIII_{dB928}/EDHPro bzw. pCMVFVIII_{dB928}/EDHPro und pCMVFVIIIc/EDHPro transfiziert und der HyB-Selektion unterzogen. Die daraus resultierenden Zellklone wurden entsprechend Beispiel 1 auf ihre RNA-Struktur untersucht. Die gebildeten RNAs lagen dicistronisch vor. Die Abschätzung der vorhandenen Gen-Kopienanzahl wurde mittels Southern Blot-Analyse durchgeführt und bewegte sich bei den untersuchten 293 Zellen im Bereich von 1-2, bei den untersuchten SK-HEP-1-Zellen bei 5-10.

Die Amplifikation der transfizierten FVIII_{dB928}-exprimierenden SK-HEP-1 Zellen via hph von 200µg HyB/ml auf 1500µg HyB/ml zeigte deutlich den Effekt der Genamplifikation, wie es in Fig. 9 dargestellt ist. Die TaqI-geschnittene zelluläre DNA des initial selektierten Zellklones #1963 wurde der des daraus hervorgegangenen, auf 1500µg HyB/ml amplifizierten Zellklones #3310 gegenübergestellt. Nach allen Hybridisierungen mit einer Faktor VIII (Spur 1-4), dhfr (Spur 9-12) und hph (Spur 5-8) spezifischen Sonde zeigte sich dabei eine Verstärkung der Signalintensitäten bei Klon #3310 im Vergleich zu #1963. Der interne Standard ist durch die Reaktion der endogenen Faktor VIII-Banden gegeben. Durch den Vergleich dieser endogenen Faktor VIII-Banden der SK-HEP-1 Negativkontrolle (Spur 1) mit denen der Klone #1963 (Spur 2) und #3310 (Spur 3) ist auch die Abschätzung der vorhandenen Faktor VIII Gen-Kopien bzw. die Angleichung der aufgetragenen DNA-Menge möglich. In den Spuren 4, 8 und 12 ist jeweils das Referenzplasmid pCMVFVIII_{dB928}/EDHPro dargestellt.

Für die Umstellung von HyB-Selektion auf DHFR-Amplifikation wurde als optimale MTX-Konzentration 100nM MTX ermittelt. Die anschließende Amplifikation erfolgte entsprechend dem Prinzip der üblichen DHFR-Amplifikation (siehe Beispiel 1).

Der aus der Subklonierung des SK-HEP-1-Klons #1963 hervorgegangene Zellklon #5235 wurde bei der ECACC hinterlegt und hat die amtliche provisorische Kenn-Nummer 94 092111.

Expression von Faktor VIII: Expression von FVIII_{dB928}: Der exprimierte FVIII_{dB928} wurde in der Western Blot-Analyse überprüft (Fig. 10). Die Zahlenwerte am Rand geben das Molekulargewicht in kDa an. Zusätzlich ist die gemessene Faktor VIII-Aktivität in milli Units (mU) angegeben. Dabei konnte gezeigt werden, daß das Faktor VIII-spezifische Bandenspektrum auftrat, mit Ausnahme einer Bande bei rund 140kDa. Der von 293 als auch SK-HEP-1-Zellen

exprimierte FVIII_{dB928} weist die typischen Banden auf, die im Zuge der Aktivierung von Faktor VIII auftreten. FVIII_{dB928} exprimiert von 293-Zellen (Spur 1 und 2) unterschied sich insofern von Faktor VIII aus SK-HEP-1-Zellen (Spur 5 und 6), als in größerem Ausmaß die Banden bei 50, 45 und 43 kDa nachgewiesen werden konnten.

Die Expression von FVIII_{dB928} und komplettem Faktor VIII in 293- und SK-HEP-1-Zellen ist in Tabelle 2 zusammengefaßt. 293-Zellen exprimierten initial 100-200mU FVIII_{dB928}/10⁶-Zellen und 24h, diese Werte ließen sich nach Subklonierung weiter steigern.

Tabelle 2

	293-Zellen/EDH-System	SK-HEP-1-Zellen/EDH-System	CHO-Zellen (Dorner et al. JCB 105; 2666 (1987); Kaufman et al., 1988)
	mU/10 ⁶ -Zellen	mU/10 ⁶ -Zellen	mU/ml
Initialexektion	FVIII _{dB928} : 100 - 200 FVIII _c : 5-10	FVIII _{dB928} : 300 - 1000 FVIII _c : 5-10	FVIII _{dB} : nicht gezeigt FVIII _c : 0,1
Amplifikation	/	/	/
1500µg HyB	/	FVIII _{dB928} : 1000 - 3000	/
1 µM MTX	/	/	FVIII _{dB} : 1000-2000
1mM MTX + vWF			FVIII _c : 1000

Die FVIII_{dB928} transfizierten SK-HEP-1-Zellen zeigten eine initiale Expression von 300mU FVIII_{dB928}/10⁶-Zellen und 24h, nach Subklonierung stieg dieser Wert auf 500-1000mU FVIII_{dB928}/10⁶-Zellen und 24h. Die Amplifikation ausgehend von 200µg HyB auf 1500µg HyB führte zu einer Expressionssteigerung bis zu 3000mU FVIII_{dB928}/10⁶-Zellen und 24h. Die Amplifikation über den DHFR-Anteil des EDH-Markers erfolgte wie bei Beispiel 1 beschrieben, da die hier dargestellten Zellklone noch über das Potential der mit der üblichen DHFR-Amplifikation einhergehenden Expressionssteigerung verfügten.

Expression von komplettem Faktor VIII: Die FVIII_c-transfizierten 293 und SK-HEP-1-Zellen wiesen unter HyB-Selektion eine maximale Expression von 10mU FVIII_c/10⁶-Zellen und 24h auf. Die weitere Amplifikation erfolgte wie oben beschrieben.

Die mit dem hier beschriebenen System erzielten Expressionswerte sind vor allem in dem Zusammenhang mit den in der Literatur erreichten Expressionsdaten zu beurteilen. Die hier beschriebenen FVIII_c/SK-HEP-1-Zellen exprimierten bereits initial 10mU FVIII_c/10⁶-Zellen und 24h. Der Vergleich der in der Literatur beschriebenen Expressionen von bekannten, B-Domänen deletierten Faktor VIII-Konstrukten mit dem hier beschriebenen System fällt ähnlich aus. Im hier beschriebenen System der Expression von FVIII_{dB928}/EDHPro in SK-HEP-1-Zellen ließen sich ohne MTX-Amplifikation bereits 3U FVIII_{dB928}/10⁶-Zellen und 24h nachweisen. Dieser Wert ist vor allem unter Berücksichtigung des noch nicht genutzten DHFR-Amplifikationspotentials zu beurteilen, welches sich wie bei Kaufman et al., 1988, supra beschrieben für bis zu 10000facher Expressionssteigerung nutzen ließ. Zusätzlich eröffnet gemäß Kaufman et al., 1988, die Möglichkeit der vWF-Coexpression eine weitere Steigerung der Faktor VIII-Ausbeute.

Zusammenfassend läßt sich die Expression von Faktor VIII in CHO der in humanen Leberzellen wie SK-HEP-1 Zellen wie in Tabelle 3 gegenüberstellen.

Tabelle 3

CHO-Zellen als FVIII-Expressionssystem	SK-HEP-1-Zellen als FVIII-Expressionssystem
--	---

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Tabelle 3 (fortgesetzt)

5 10 15 20	<p>-nach initialer Selektion nicht nachweisbare Expression von B-Domänen deletiertem FVIII und FVIIIc</p> <p>-"blinde" Amplifikation notwendig</p> <p>-dadurch sehr großer "Screening"-Aufwand</p> <p>-aufgrund der geringen FVIII-Expression ist sehr hohe Amplifikation erforderlich, die sehr zeitaufwendig ist</p> <p>-die hohe Amplifikation erfordert mehr "Screening"</p> <p>-CHO-Zellen verfügen über "double minute" Chromosomen, die mit instabiler Fremdprotein-Expression verbunden sind</p> <p>-hohe Amplifikation bewirkt ein größeres Maß an genetischer und expressions bezogener Instabilität</p> <p>-Unterschiede der posttranslationalen Modifikationen von Fremdproteinen (z.B. Glykosylierungen) im Vergleich zu humanen Proteinen</p> <p>-mögliche Unterschiede des FVIII, da er in Ovarienzellen exprimiert wurde</p>	<p>hohe FVIIIIdB928 und FVIIIc-Expression nach initialer Selektion</p> <p>-dadurch gezielte Amplifikation derjenigen Zellklone, die initial die größte Menge an FVIII exprimieren</p> <p>-damit verbunden wesentlich geringerer "Screening"-Aufwand</p> <p>-Zeitersparnis aufgrund der rascheren Herstellung hoch FVIII exprimierender Zelllinien</p> <p>-aufgrund der initial relativ hohen Expression von FVIII ist geringere Amplifikation ausreichend</p> <p>-dadurch verringert sich das "Screening"-Ausmaß</p> <p>-eine geringere Anzahl an Gen-Kopien läßt sich leichter stabilisieren</p> <p>-keine Spezies abhängigen Veränderungen der posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen</p> <p>-authentischer FVIII, da er in einer Leberzelllinie exprimiert wurde</p>
---------------------------------	--	---

Beispiel 3: Expression des von Willebrand-Faktors in transformierten Zellen unter spezieller Berücksichtigung von humanen Leberzelllinien.

Von Willebrand Faktor (vWF) kommt eine bedeutende Rolle im Rahmen seiner Faktor VIII stabilisierenden Funktion zu. Aus diesem Grund war einerseits die Coexpression von vWF zusammen mit Faktor VIII interessant, andererseits war auch die Expression von vWF allein bedeutend.

Konstruktion der Plasmide:

pAct/MCS: pActin beinhaltet den 3.3kb großen Promoter des menschlichen β Actin-Gens sowie 1kb der 5' UTR des β Actin-Gens. Die 5' UTR enthält das erste Intron des β Actin-Gens. Es schließt sich eine MCS an, gefolgt von der SV40-Polyadenylierungsstelle. pActin basiert auf Plasmid pSV β (MacGregor und Caskey, supra, siehe Beispiel 1). Aus dem resultierenden Plasmid pSVMCS wurde das den SV40-Promoter/Enhancer und das SV40 16/19S-Intron enthaltende EcoRI-Sall-Fragment entfernt; stattdessen wurde das Actin-Promoter und 5' UTR Actin-Intron enthaltende EcoRI-Sall-Fragment aus pH β APr-1 (Gunning et al., PNAS 84: 4831, 1987) eingesetzt. Dieses Plasmid wurde pActin genannt. Dieses Plasmid wurde mit ClaI und Sall geschnitten und mit den Oligonucleotiden #1293: 5' TCG ATG TTA ACT ACG TAG CTA GCG CGG CCG CCG TAC GTC GCG AGT CGA CAA TAT TGA TAT CGG TAC CGG TAC CAC TAG TGT 3' (SEQ.ID.No. 22) und #1294: 5' CGA CAC TAG TGG TAC CGG TAC CGA TAT CAA TAT TGT CGA CTC GCG ACG TAC GGC GGC CGC GCT AGC TAC GTA GTT AAC A 3' (SEQ.ID.No. 23) ligiert. Daraus entstand das

Konstrukt pAct/MCS.

pAct/EDHPro: pAct/MCS wurde mit EcoRV geschnitten und das 2200bp große EDHPro-Fragment als SmaI und BglII, Pol. K. behandeltes Fragment aus pCMV/EDHPro eingesetzt, sodaß das Plasmid pAct/EDHPro entstand.

pActvWF/EDHPro: Ein aus ph-Act-vWF (Fischer et al., FEBS Letters 351; 345 (1994)) ausgeschnittenem EcoRI-Fragment, das die gesamte cDNA des menschlichen vWF, sowie etwa 200bp 5' und 130bp 3' UTR enthält, wird mit Pol. K. aufgefüllt und in die NruI-Schnittstelle von pAct/EDHPro eingesetzt. Daraus resultierte das Plasmid pActvWF/EDHPro (Fig. 11).

Abgesehen vom gesamten kodierenden Bereich des vWF enthält dieses Fragment 200bp der untranslatierten (UTR) 5'-Region und 150bp der untranslatierten 3'-Region.

Herstellung der permanenten Zelllinien: Initialexpression und Amplifikation erfolgten wie bei Beispiel 2 beschrieben.

vWF-Quantifizierung mittels ELISA: Die vWF-Quantifizierung erfolgte mittels des von Boehringer Mannheim, BRD erhältlichen ELISA-Systems (*Aserachrom vWF, Nr. 136 0272).

Proteinnachweis mittels Western Blot-Analysen: Die Western Blot-Analysen wurden entsprechend den Beschreibungen in Beispiel 2 durchgeführt. Als erster Antikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-Anti-vWF-Antikörper (Firma Dakopatts, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde ein Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (Firma BioRad, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:7500 verwendet.

Untersuchungen der DNA- und RNA-Struktur: Die Präparationen von DNA und RNA erfolgten wie in Beispiel 1 beschrieben. Zur Hybridisierung im Rahmen der Southern Blot-Analysen bzw. Northern Blot-Analysen wurden vWF-, dhfr- und hph-Fragmente aus den jeweiligen Plasmiden isoliert (also aus pActvWF/EDHPro, pSVDHFR, pCMV/Hy).

Herstellung und Analyse von pActvWF/EDHPro-transfizierten Zelllinien: Analog den Beschreibungen bei Beispiel 2 wurden 293- und SK-HEP-1-Zellen mit dem Expressionsplasmid pActvWF/EDHPro transfiziert und stabil vWF-exprimierende Zelllinien selektiert und im Rahmen von Southern Blot-Analysen charakterisiert. Im Anschluß an die Selektion mit HyB wurden sowohl 293- als auch SK-HEP-1-Zellen ausgehend von 100nM MTX über die dhfr-Einheit des EDH-Markers amplifiziert. In beiden Fällen wurde vWF in großen Mengen exprimiert. Die Identität des exprimierten vWF mit plasmatischem vWF wurde mittels Western Blot-Analysen festgestellt. Die vWF-Quantifizierung erfolgte mittels ELISA-Bestimmungen. Zusätzlich wurde die Ristocetin-induzierte Trombozyten-Aggregation mittels des entsprechenden Tests der Behringwerke (OUBD, von Willebrand Reagenz) untersucht.

10 Beispiel 4: Expression von rekombinantem, humanen Faktor IX in SK-HEP-1- und 293-Zellen

Aus einer "randomly primed" humanen Leber Lambda gt10 Phagen-Bibliothek wurde die cDNA des humanen Faktor IX isoliert. Das Faktor IX cDNA-Fragment umfaßt neben der kodierenden Region 4 Nukleotide der 5' UTR und 48 Nukleotide der 3' UTR. Dieses 1,4kb große, von EcoRI-Linkern flankierte Fragment wurde anschließend in die EcoRI-Stelle des Plasmids Bluescript II KS- (Stratagene) gesetzt. Dieses Plasmid wurde pBluell KS- FIX genannt.

Wie in Fig. 12 schematisch beschrieben, wird mittels Standard-Klonierungs-Methoden (Maniatis et al., supra) die Faktor IX-cDNA als EcoRI-Fragment in das ebenfalls EcoRI-geschnittene Plasmid pCMV-MCS V gesetzt und ergibt pCMV-FIX. pCMV-MCS-V ist ein Folgeplasmid von pCMV-MCS (siehe Beispiel 1); in dessen XhoI-Stelle wurde die MCS mit der Sequenz 5'-TCGAATCGA TTGAATTCCC CGGGGTCTC TAGAGTCGAC CTGCAGAAGC TTAGTAC-TAG TAGGCCTAGG GCCCTATCGA-3' (SEQ.ID.No. 24) eingefügt.

Das resultierende Plasmid pCMV-FIX wurde mit SmaI und AvrII geöffnet und die EDH-Kassette aus Plasmid pB4/EDHPro als EcoRV/XbaI-Fragment eingesetzt. Das resultierende Plasmid ist pCMV-FIX-EDHPro.

pB4/EDHPro: Die EDH-Kassette wurde als SmaI, BglII-Fragment aus pCMV/EDHPro isoliert und in den SmaI, BamHI-geschnittenen Vektor pBluescript II SK- (Pharmacia, Schweden) eingesetzt.

293-(ATCC, CRL 1573) und SK-HEP-1-(ATCC, HTB 52)-Zellen, die routinemäßig in DMEM/Ham's F12-Medium supplementiert mit 2mM Glutamin und 10% fötalem Kälberserum wachsen, wurden mittels CaPO₄-Methode bzw. Elektroporation (BioRad Gene Pulser) zur Aufnahme von pCMV-FIX-EDHPro gebracht. Zwei Tage nach DNA-Aufnahme wurden die Zellen in unterschiedlichen Zelldichten ausplattiert, und das Medium zur Selektion mit 100µg (293) bzw. 200µg (SK-HEP-1) Hygromycin B/ml versehen. Zwei Wochen später wurden die resultierenden Zellklone isoliert und in separaten Zellkultur-Schalen zur Konfluenz gewachsen. In serumfreien 24 Stunden-Zellkulturüberständen, die mit 10µg Vitamin K₁/ml supplementiert sind, wurden anschließend Antigenmenge (ELISA), Funktionalität (entsprechende Aktivitätstests) und qualitative Integrität (Western Blot-Analyse) des sekretierten, rekombinanten Proteins untersucht. Die Zellzahl wurde nach Trypsinieren der Zellen (im Zellzählmeßgerät der Fa. Schärfe, Reutlingen, Deutschland) bestimmt.

Zur Faktor IX-Antigen-Bestimmung wurde der Test-Kit der Fa. Boehringer Mannheim (Asserachrom Factor FIX-Ag, Diagnostica Stago) verwendet, wobei zur Standardkurven-Erstellung ein Referenzplasma (das IMMUNO Referenzplasma 5220005) verwendet wurde.

Zum Nachweis der Gerinnungsaktivität wurde ein Ein-Stufen- Gerinnungstest unter Verwendung eines Amelung KC10-Coagulometers eingesetzt. Hierbei wurden zunächst jeweils gleiche Teile der zu bestimmenden Probe, Faktor IX-Mangelplasma und Phospholipid/Kaolin-Aktivator-Lösung bei 37°C 4 min. inkubiert, anschließend zum Start der Reaktion ein Teil 25mmol CaCl₂ addiert, die Gerinnungszeit gemessen, und mit einer mittels eines Faktor IX-Standards erstellten Standardkurve ermittelt.

Zur Western Blot-Analyse wurden 10µl Zellkulturüberstand reduziert und denaturiert, und in denaturierenden 4% Sammel-/8%-Trenngelen nach Lämmli (Nature 227: 680, 1970) mit dem BioRad Mini-Protean II Dual Slab Gel-System aufgetrennt (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA). Die Proteine wurden nach erfolgtem Gellauf mit dem BioRad Mini Trans-Blot-System (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) in Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin) auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Zur Visualisierung des rekombinanten Proteins wurde das Protoblot-System der Fa. Promega (Madison, WIS, USA) verwendet. Als Antikörper zur Faktor IX-Bindung wurde Kaninchen-Anti-Faktor IXSerum der Fa. Dakopatts (Glostrup, Dänemark) eingesetzt.

Aktivitäts- und Antigen-Ausbeuten typischer Zellklone und zugehöriger Negativ-Kontrollen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Expression von rekombinantem Faktor IX in 293- und SK-HEP-1-Zellklonen

Sup-No.	In-Protein	$\mu\text{g/ml}$ (Antigen)	mU/ml (Aktivität)	Zelllinie	Aktivität/ Antigen
520-72	Faktor IX	1,4	127	293	0,36
520-168	Faktor IX	2,2	96	293	0,17
520-240	Faktor IX	1,0	47	293	0,19
543-1	Keines	0	0	293	Neg. Kontrolle
550-336	Faktor IX	1,0	298	SK-HEP-1	1,19
550-360	Faktor IX	0,9	267	SK-HEP-1	1,19
550-96	Faktor IX	2,0	288	SK-HEP-1	0,58
551-24	Keines	0	0	SK-HEP-1	Neg. Kontrolle

1 Unit Faktor IX entspricht $4\mu\text{g/ml}$. Zellen gewachsen bei $10\mu\text{g}$ Vitamin K₁/ml.
Antigen bestimmt durch ELISA, Aktivität durch Gerinnungs-Test.

Prinzipiell läßt sich aus den Expressionsdaten schließen, daß mit dem erfindungsgemäßen Expressionssystem im Vergleich zu dem in der Literatur beschriebenen CHO-Expressionssystem bereits bei nicht-amplifizierten initialen Zellklonen erheblich höhere Expressionswerte von rekombinantem Faktor IX in SK-HEP-1- und 293-Zellen erzielen lassen, und der Anteil von funktionellem Faktor IX am Gesamt-Faktor IX wesentlich größer ist. Ein weiterer Vorteil des hier beschriebenen Selektionssystems besteht darin, daß von allen nach Transfektion/Elektroporation isolierten Einzelklonen alle (>95%) auch rekombinanten Faktor IX produzieren; dies steht im krassen Gegensatz zu dem herkömmlichen CHO-dhfr-Expressionssystem, in dem sowohl bei Cotransfektion als auch bei Verwendung bicistronischer mRNAs ohne interne Ribosomen-Bindungsstellen nur ein Bruchteil der isolierten Klone Faktor IX produzieren (Ehrlich et

al., JBC 264: 14298, 1989).

Fig. 13 zeigt den Western Blot von rekombinantem Faktor IX aus repräsentativen 293- und SK-HEP-1-Zell-Klonen im Vergleich zu plasmatischem Faktor IX und rekombinantem Faktor IX aus CHO-Zellen.

Rekombinanter Faktor IX aus allen drei Zelllinien zeigt ein dem plasmatischen Faktor IX vergleichbares Molekulargewicht. 293-Faktor IX wurde vom 293-Klon 291-14 erhalten, SK-HEP-1-Faktor IX vom Zellklon EP 9. Als Kontrolle wurde auch rekombinanter Faktor IX aus dem CHO-Zellklon F 48, der mittels konventioneller Faktor IX/dhfr-Cotransfektion erstellt wurde, aufgetragen. 293-, SK-HEP-1- und CHO-Zellen, die keine Expressionsplasmide enthalten, produzieren keinen Faktor IX.

Bei den Expressionsdaten sei noch im speziellen darauf hingewiesen, daß das Amplifikationspotential im vorliegenden Beispiel noch nicht ausgenutzt wurde. Die Ausbeuten lassen sich nach erfolgter Amplifikation noch drastisch steigern.

Beispiel 5: Expression von rekombinantem, humanen Protein C in SK-HEP-1- und 293-Zellen

Aus einer "randomly primed" humanen Leberzell- λ gt10-Phagen-Bibliothek wurde die cDNA des humanen Protein C isoliert. Neben der kodierenden Region enthält die cDNA auch 100bp der untranslatierten (UTR) 5'-Region und 500bp der untranslatierten 3'-Region, und ist beiderseits von EcoRI-Schnittstellen flankiert. Dieses 1,9 kb große Fragment wurde in die EcoRI-Stelle des Plasmids pUC13 (Pharmacia) eingesetzt und pPrC-1 genannt.

pPrC-1 enthält auf Aminosäureebene im Vergleich zur publizierten Protein C-Sequenz (Beckman et al., NAR 13: 5233, 1985; Foster und Davie, PNAS 81:4766, 1984) zwei Unterschiede: Codon 76 des reifen Protein C enthält statt der publizierten Sequenz TTC das Triplet CTC (dies resultiert in einem Aminosäureaustausch von PHE zu LEU); zum anderen weist pPrC-1 eine in-frame-Deletion jener 5 Codons (5'-GGC GAC AGT GGG GGG-3') auf, die für die Aminosäuren 358 bis 362 (GLY-ASP-SER-GLY-GLY) des reifen Protein C kodieren.

Mittels Standard-Klonierungs-Methoden (Maniatis et al., supra) wurde mit PstI ein 1.5kb großes Protein C-Fragment (welches den 5' UTR, jedoch nur noch 15bp des 3' UTR-Bereichs enthält) aus pPrC-1 ausgeschnitten und in den PstI geöffneten pTM3 (Moss et al., Nature 348:91, 1990) inseriert; das resultierende Plasmid ist pTM3-PrC.

Unter Verwendung eines Mutagenese-Sets (Sculptor In Vitro Mutagenesis Kits (Firma Amersham) und des DNA-Primers 5'-TGTGAGCTGCCCCATGGTGGAGGCACTGGC 3' (SEQ.ID.No. 25) wurde die mit dem Translationsinitiationscodon ATG überlappende DNA-Sequenz in pTM3-PrC in eine NcoI-Schnittstelle umgewandelt. Das resultierende Plasmid wurde NcoI geschnitten, und religiert, um die in pTM3 gelegene NcoI-Schnittstelle an die neu geschaffene NcoI Schnittstelle am 5'-Ende des kodierenden Bereiches der PrC-cDNA zu fusionieren. Hierdurch ging der gesamte 5' UTR der PrC-cDNA verloren.

Mit Hilfe des Sculptor In Vitro Mutagenesis Kits und des Primers 5'-GTGGAAGGAGGCGACCATGGGCCCCCACTGTGCGCCCTCGCAGGCATCCTGCCGGTC-3' (SEQ.ID.No. 26) wurden zunächst die fehlenden 15 Nukleotide wieder in pTM3-PrC inseriert, um die o.g. Deletion zu reparieren. Das resultierende Plasmid wurde pTM3-PrCpt. mut. genannt.

Auf analoge Art wurde schließlich mit dem Primer 5'-GCAGTCGCAGCTGAAGCTGCCGAT-3' (SEQ.ID.No. 27) in pTM3-PrCpt. mut. die Punktmutation in Codon 76 in die Wildtyp-Sequenz verändert. Das resultierende Plasmid wurde pTM3-PrCwt. genannt.

Wie in Fig. 14 schematisch beschrieben, wurden die PCwt bzw. PCpt. mut. cDNA-Fragmente aus pTM3-PCwt. bzw. pTM3-PCpt. mut. als NcoI, StuI-Fragment in das NcoI, SmaI geschnittene Plasmid pCMV-MCS I gesetzt. pCMV I ist ein Abkömmling des Plasmids pCMV-MCS. Dieses Plasmid beinhaltet den "Immediate Early Gene"-Promoter/Enhancer des menschlichen Cytomegalovirus und 80bp der 5' UTR des zugehörigen Gens. Es schließt sich die MCS mit der Sequenz 5'-TCGACCATGGAAGCTTATCGATCCCGGGAA TTCGGTACCG TCGACCTTGCA GGTGCACGGG CCCAGATCTG ACTGATCGA-3' (SEQ.ID.No. 28) an, gefolgt von dem SV40 16S/19S-Intron und der SV40-Polyadenylierungsstelle.

Die resultierenden Plasmide pCMV-PCwt bzw. pCMV-PCpt. mut. wurden mit KpnI geöffnet und die EDH-Kassette aus Plasmid pB4/EDHPro (siehe Beispiel 4) als KpnI-Fragment eingesetzt. Die resultierenden Plasmide sind pCMV-PCwt-EDHPro bzw. pCMV-PCpt. mut.-EDHPro.

Beide Plasmide wurden, wie in Beispiel 4 beschrieben, in 293-(ATCC, CRL 1573) und SK-HEP-1-(ATCC, HTB 52)-Zellen eingeschleust und Zellklone isoliert.

In serumfreien 24 Stunden-Zellkulturüberständen, die mit 10 μ g Vitamin K₁/ml supplementiert sind, wurden anschließend Antigenmenge (ELISA), Funktionalität (entsprechende Aktivitätstests) und qualitative Integrität (Western Blot-Analyse) des sekretierten, rekombinanten Proteins untersucht. Die Zellzahl wurde nach Trypsinieren der Zellen (im Zellzahlmeßgerät der Fa. Schärfe, Reutlingen, Deutschland) bestimmt.

Zur Protein C-Antigen-Bestimmung wurde ein Test-Kit (Asserachrom Factor Protein C-Ag, Diagnostica Stago, Fa. Boehringer Mannheim) verwendet, wobei zur Standardkurven-Erstellung ein mitgelieferter Standard benutzt wurde.

Zum Nachweis der Gerinnungsaktivität wurde ein Ein-Stufen-Gerinnungstest unter Verwendung eines Amelung

KC4-Coagulometers eingesetzt. Hierbei wurden zunächst jeweils gleiche Teile der zu bestimmenden Probe, Protein C-Mangelplasma, Protac und Phospholipid/Kaolin-Aktivator-Lösung bei 37°C 4 min. inkubiert, anschließend zum Start der Reaktion ein Teil 25mmol CaCl₂ addiert, die Gerinnungszeit gemessen, und mit einer mittels eines Protein C-Standards erstellten Standardkurve ermittelt.

5 Zur Western Blot-Analyse wurden 10µl Zellkulturüberstand reduziert und denaturiert, und in denaturierenden 4% Sammel-/10% Trenngelen nach Lämmli (Nature 227: 680, 1970) mit dem BioRad Mini-Protean II Dual Slab Gel-System aufgetrennt (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA). Die Proteine wurden nach erfolgtem Gellauf mit dem BioRad Mini Trans-Blot-System (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) in Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin) auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Zur Visualisierung des rekombinanten Proteins wurde das Protoblot-System

10 der Fa. Promega (Madison, WI, USA) verwandt. Als Antikörper zur Protein C-Bindung wurde Kaninchen-Anti-Protein C-Serum (Fa. Dakopatts; Glostrup, Dänemark) eingesetzt. Aktivitäts- und Antigen-Ausbeuten typischer Zellklone und zugehöriger Negativ-Kontrollen sind in Tabelle 5 aufgeführt; Fig. 15 zeigt den Western Blot von rekombinanten Protein C aus 293- und SK-HEP-1-Zellen im Vergleich zu plasmatischem Faktor IX.

15 Während in nicht-transfizierten SkHepl-Zellen (Probe 563-00) kein Protein C nachweisbar ist, zeigen sowohl mit wt wie auch mit punktmutierter Protein C-cDNA transfizierte 293 bzw. SkHepl-Zellen entsprechende Expression. In allen Fällen sind schwere und leichte Ketten des Protein C nachweisbar, vergleichbar dem plasmatischen Protein C. Von 293 und SkHepl-Zellen produziertes wt-Protein C ist jedoch nur zu etwa 50% (Klone 568-12, 568-3) bzw. 30% (Klone 563-15, 563-8) in schwere und leichte Ketten prozessiert, während das verbleibende Material als unprozes-

20 siertes "single-chain"-Molekül vorliegt. Im Gegensatz dazu ist das punktmutierte Protein C zum überwiegenden Teil in schwere und leichte Ketten prozessiert, wie an den Überständen der beiden 293 Zellklone 540-18 und 540-20 ersichtlich ist. Die Molekulargewichte eines mit aufgetragenen Größenmarkers sind an der rechten Seite der Fig. 15 angegeben.

25 Der Artikel von Grinnell et al., Adv. Appl. Biotechnol. Series 11: 29-63, 1990, faßt die wt-Protein C-Expressionsdaten der Arbeitsgruppe bei Eli Lilly zusammen. Hieraus wird ersichtlich, daß bei initialselektierten, nicht-amplifizierten Zellklonen die maximal erreichten Expressionsdaten 1,15 µg/10⁶-Zellen und Tag nicht überschritten; bei dem von uns beschriebenen Expressionssystem sind im Gegensatz dazu durchaus 3-fach höhere Expressionsraten möglich, wie im Falle des Klons 568-12 demonstriert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Expression von rProtein C wt und pt. mut. in 293 und SK-HEP-I Zell-Klonen

Sup.-No.	heiProtein	$\mu\text{g/ml}$ (Antigen-)	mU/ml (Aktivität Ger.hemm.)	mU/ml (Aktivität amid. Test)	$\mu\text{g}/10^6$ Zellen	Zelllinie-	Aktivität/ Antigen (Ger.hemm.)
563-15	PCwt	4,7	130	130	1,8	SK-HEP-I	0,11
563-8	PCwt	2,5	n.d.	75	1,3	SK-HEP-I	n.d.
540-18	PC pt. mut.	1,4	185	112	0,38	SK-HEP-I	0,53
540-20	PC pt. mut.	1,2	193	103	0,41	SK-HEP-I	0,64
563-00	Keines	0	0	10	.	SK-HEP-I	Neg. Kontrolle
540-00	Keines	0	0	0	.	293	Neg. Kontrolle
568-12	PCwt	11,4	>1000	470	3,2	293	>0,35
568-3	PCwt	3,4	645	178	1,1	293	0,76

1 Unit Protein C entspricht 4 $\mu\text{g/ml}$. Zellen gewachsen bei 10 μg Vitamin K₁/ml.

Antigen bestimmt durch ELISA, Aktivität durch amidolytischen Test und Gerinnungshemmungstest.

'n.d.' bedeutet 'nicht durchgeführt'

Beispiel 6: Expression von humanem Serum Albumin (HSA) in transformierten SK-HEP-1-Zellen

Konstruktion des HSA-Expressionsplasmids:

5 Das Expressionsplasmid pCMVFVIIIIdB928/EDHPro (siehe Beispiel 2) wurde mit SmaI und SalI geschnitten, die FVIII-cDNA entfernt und mit der SmaI, SalI geschnittene HSA-cDNA aus pAlb4 ligiert. Dabei entstand das Expressionsplasmid pCMVHSA/EDHPro (Fig. 17).

Herstellung und Analyse von pCMVHSA/EDHPro-transfizierten Zelllinien:

10 Analog den Beschreibungen bei Beispiel 2 wurden SK-HEP-1-Zellen mit dem Expressionsplasmid pCMVHSA/EDHPro transfiziert und stabil HSA-exprimierende Zelllinien selektiert. Die Selektion erfolgte mit HyB beginnend bei 200 µg/ml und wurde in der Folge auf 400 µg/ml erhöht. Im Anschluß an die Selektion mit HyB wurden die SK-HEP-1-Zellen ausgehend von 100 nM MTX über die dhfr-Einheit des EDH-Markers amplifiziert. Auf der Stufe von 400 µg HyB konnten bis zu 1,7 µg HSA/10⁶-Zellen und 24 Stunden und 2,6 µg HSA/ml nachgewiesen werden. Die Identität des exprimierten HSA mit plasmatischem HSA und HSA aus *Pichia pastoris* wurde mittels Western Blot-Analysen festgestellt (Fig. 18).

15 Die HSA-Quantifizierung erfolgte mittels ELISA-Bestimmungen.

Materialien und Methoden

Konstruktion der Plasmide:

20 pCMVHSA/EDHPro: pCMVFVIIIIdB928/EDHPro wurde mit SmaI und SalI geschnitten, das FVIIIIdB928-Fragment entfernt und stattdessen ligiert mit dem SmaI, SalI geschnittene HSA-Fragment aus pAlb4 (Fig. 17). pAlb4 setzt sich aus pBluescript 4 SK- und der HSA-cDNA (Lawn et al., Nucleic Acid Res. 9: 6103-6114, (1981); Dugaiczky et al., PNAS 79: 71-75 (1982)) zusammen.

25 Herstellung der permanenten Zelllinien:

Initialexektion und Amplifikation erfolgten wie in Beispiel 2 beschrieben.

30 HSA-Quantifizierung mittels ELISA:

Die HSA-Quantifizierung im ELISA erfolgte mittels des monoklonalen Anti-HSA-Antikörpers (Pierce) und des von Dakopatts, Dänemark, erhältlichen Kaninchen-Anti-HSA-Antikörperserums, welches direkt mit Peroxidase gekoppelt vorlag.

35 Proteinnachweis mittels Western Blot-Analysen:

Die Western Blot-Analysen wurden entsprechend den Beschreibungen in Beispiel 2 durchgeführt. Als erster Antikörper wurde ein monoklonaler Anti-HSA-Antikörper (Monosan; Sanbio, Niederlande) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde ein Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Firma BioRad, USA) in einer Verdünnung von 1:7500 verwendet.

45 Patentansprüche

1. Expressionsplasmid, das eine dicistronische Transkriptions-/Translationseinheit enthält, welche eine Sequenz für ein Fremdprotein und eine Sequenz für ein Fusionsprotein umfaßt, wobei das Fusionsprotein mindestens einen Selektions- und mindestens einen Amplifikationsmarker enthält.
- 50 2. Expressionsplasmid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die dicistronische Transkriptions/Translationseinheit zusätzlich eine interne Ribosomenbindungsstelle umfaßt.
3. Expressionsplasmid nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die interne Ribosomenbindungsstelle die 5'-nicht-translatierte Region des Encephalomyocarditis Virus (EMCV 5'UTR) ist.
- 55 4. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Sequenz für das Fremdprotein 5' und die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein 3' von der internen Ribosomenbindungsstelle liegt.

5. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Fremdgen und die Sequenz für das Fusionsprotein in eine dicistronische mRNA transkribierbar sind.
- 5 6. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die dicistronische Transkriptions-/Translationseinheit nur einen Promotor, vorzugsweise den CMV-Promotor, den SV 40-Promotor oder den humanen β -Actin-Promotor, umfaßt.
7. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die dicistronische Transkriptions-/Translationseinheit zusätzlich ein Intron, vorzugsweise das Intron des SV40 t-Antigens, das 16s/19s-Intron oder das erste Intron des humanen β -Actin-Gens, und ein Poly-Adenylierungssignal, vorzugsweise das der frühen oder späten Transkriptionseinheit des SV40-Virus, enthält.
- 10 8. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fusionsprotein aus zwei Teilsequenzen, nämlich einem hochamplifizierbaren Amplifikationsmarker-gen, vorzugsweise dem Dihydrofolat Reduktase-Gen, und einem Selektionsmarker-gen, vorzugsweise dem Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen, besteht.
- 15 9. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Selektions-/Amplifikationsmarker-Fusionsprotein bifunktionell ist und die für das Fusionsprotein kodierende Sequenz so konstruiert ist, daß der 5'-kodierenden Teilsequenz das Stopkodon und der 3'-kodierenden Teilsequenz gegebenenfalls das Startkodon fehlt.
- 20 10. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die kodierenden Sequenzen der beiden Proteinanteile der Sequenz für das Fusionsprotein durch einen Spacer getrennt sind, der insbesondere aus einem 15 Nukleotide langen Spacer besteht.
- 25 11. Expressionsplasmid nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Spacersequenz für 5 Glycinreste kodiert und die Sequenz GGA GGC GGG GGT GGA (SEQ.ID.NO. 2) aufweist.
- 30 12. Expressionsplasmid nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Spacersequenz für 5 Prolinreste kodiert und die Sequenz CCA CCC CCG CCT CCA (SEQ.ID.NO. 1) aufweist.
13. Expressionsplasmid pCMV/EDH-Sp, pCMV/EDHGly oder pCMV/EDHPro.
- 35 14. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fremdprotein eine Sequenz für ein humanes Plasmaprotein oder ein virales Protein bzw. ein Derivat oder ein Fragment davon umfaßt.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fremdprotein eine Sequenz für die humane Prothrombin-cDNA umfaßt.
- 40 16. Expressionsplasmid pCMVFII/EDH-Sp, pCMVFII/EDHGly oder pCMV-FII/EDHPro.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fremdprotein eine Sequenz für die humane Faktor VIII-cDNA umfaßt.
- 45 18. Expressionsplasmid pCMVFVIIIc/EDH-Sp, pCMVFVIIIc/EDHGly oder pCMVFVIIIc/EDHPro.
19. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fremdprotein eine Sequenz für die Deletionsmutante dB928 des humanen Faktor VIII umfaßt.
- 50 20. Expressionsplasmid pCMVFVIII dB928/EDH-Sp, pCMVFVIII dB928/EDHGly oder pCMVFVIII dB928/EDHPro.
21. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fremdprotein eine Sequenz für die humane Faktor IX-cDNA umfaßt.
- 55 22. Expressionsplasmid pCMV-FIX-EDH-Sp, pCMV-FIX-EDHGly oder pCMV-FIX-EDHPro.

23. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fremdprotein eine Sequenz für die humane Protein C-cDNA umfaßt.
- 5 24. Expressionsplasmid pCMV-PCwt-EDH-Sp, pCMV-PCwt-EDHPro, pCMV-PCwt-EDHGly, pCMV-PCpt. mut.-EDH-Sp, pCMV-PCpt.mut.-EDHPro oder pCMV-PCpt. mut.-EDHGly.
25. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz für das Fremdprotein eine Sequenz für die humane von Willebrand Faktor-cDNA umfaßt.
- 10 26. Expressionsplasmide pAct-vWF-EDH-Sp, pAct-vWF-EDHPro und pAct-vWF-EDHGly.
27. Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es eine oder mehrere Expressionskassetten umfaßt, welche die DNA Sequenzen SEQ.ID.NO. 6, SEQ.ID.NO. 7 oder SEQ.ID.NO. 8 enthalten.
- 15 28. Fusionsprotein, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem hoch-amplifizierbaren Amplifikationsmarker und einem Selektionsmarker besteht.
29. Fusionsprotein nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß dem 5'-kodierenden Gen für den Amplifikationsmarker das Stopkodon und dem 3'-kodierenden Gen für den Selektionsmarker das Startkodon fehlt.
- 20 30. Fusionsprotein nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Amplifikationsmarker und der Selektionsmarker durch ein Spacerprotein getrennt sind, das vorzugsweise aus mindestens 5 Glycinresten oder aus mindestens 5 Prolinresten besteht.
- 25 31. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Selektionsmarker-Bereich eine Amplifizierungsfunktion aufweist.
32. Fusionsprotein, welches die Aminosäuresequenz SEQ.ID.NO. 3, SEQ.ID.NO. 4 oder SEQ.ID.NO. 5 aufweist.
- 30 33. Transfizierte eukaryontische Zelllinie, vorzugsweise ausgewählt aus den Zelllinien CHO, 293 oder humane Leberzelllinien, wie SK-HEP-1 oder Chang Liver, die mit einem Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 27 transfiziert ist und ein Fremdprotein exprimiert.
- 35 34. Transfizierte eukaryontische Zelllinie nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie das humane Prothrombin exprimiert.
35. Transfizierte eukaryontische Zelllinie nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie den humanen Faktor VIII exprimiert.
- 40 36. Transfizierte eukaryontische Zelllinie nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Deletionsmutante dB928 des humanen Faktors VIII exprimiert.
37. Transfizierte eukaryontische Zelllinie nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie den humanen Faktor IX exprimiert.
- 45 38. Transfizierte eukaryontische Zelllinie nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie das humane Protein C exprimiert.
- 50 39. Transfizierte eukaryontische Zelllinie nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sie den humanen von Willebrand Faktor exprimiert.
40. Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß eine eukaryontische Zelllinie mit einem Expressionsplasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 27 transfiziert wird, die erhaltenen Klone durch einen Selektionsprozeß unter der Kontrolle eines Selektionsmarkers isoliert und dabei vorzugsweise gleichzeitig amplifiziert werden, anschließend unter der Kontrolle eines Amplifikationsmarkers eine weitere Amplifikation erfolgt, wobei das Fremdprotein exprimiert und geerntet wird.
- 55

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß der Selektionsprozeß unter Verwendung von Hygromycin B und die weitere Amplifikation unter Verwendung von Methotrexat erfolgt.
- 5 42. Verfahren nach Anspruch 40 oder 41, dadurch gekennzeichnet, daß als Zelllinien CHO, 293 oder humane Leberzelllinien, wie SK-HEP-1 oder Chang Liver, mit einem Expressionsplasmid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 27 transfiziert werden.
- 10 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß rekombinante Blutgerinnungsfaktoren oder virale Proteine hergestellt werden.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß rekombinantes humanes Prothrombin, rekombinanter humaner Faktor VIII, rekombinanter humaner FVIII_{dB928}, rekombinanter humaner Faktor IX, rekombinantes humanes Protein C, rekombinanter humaner von Willebrand-Faktor oder rekombinantes humanes Serumalbumin hergestellt werden.
- 15 45. Fremdprotein-Präparation, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
46. Humane Plasmaprotein-Präparation oder virale Proteine, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
- 20 47. Aktive humane Prothrombin-Präparation, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
48. Aktive humane Faktor VIII-Präparation, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
- 25 49. Aktive humane, deletierte FVIII_{dB928}-Präparation, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
50. Aktive humane Faktor IX-Präparation, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
- 30 51. Aktive humane Protein C-Präparation, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
52. Aktive humane von Willebrand Faktor-Präparation, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 40 bis 44.
- 35 53. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Präparation gemäß einem der Ansprüche 45 bis 52.
54. Verwendung von SkHep-1-Zellen als Expressionsvehikel für Prothrombin, Faktor VIII, Faktor VIII _{dB928}, Faktor IX, Protein C, von Willebrand-Faktor und/oder Serumalbumin.
- 40
- 45
- 50
- 55

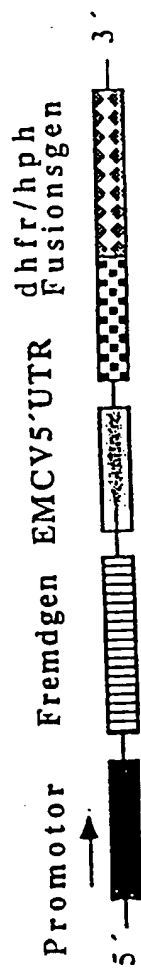


Fig. 1

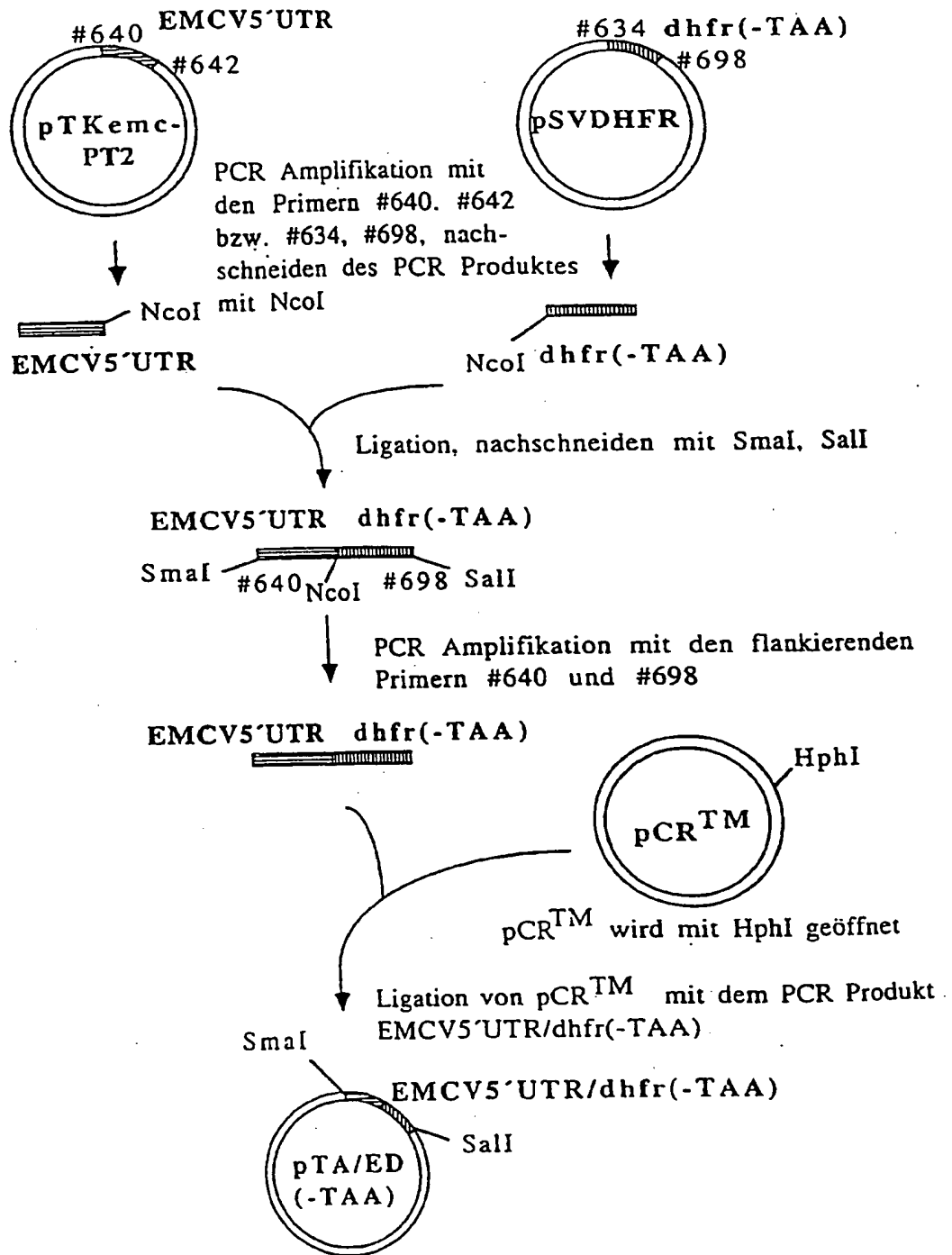


Fig.2

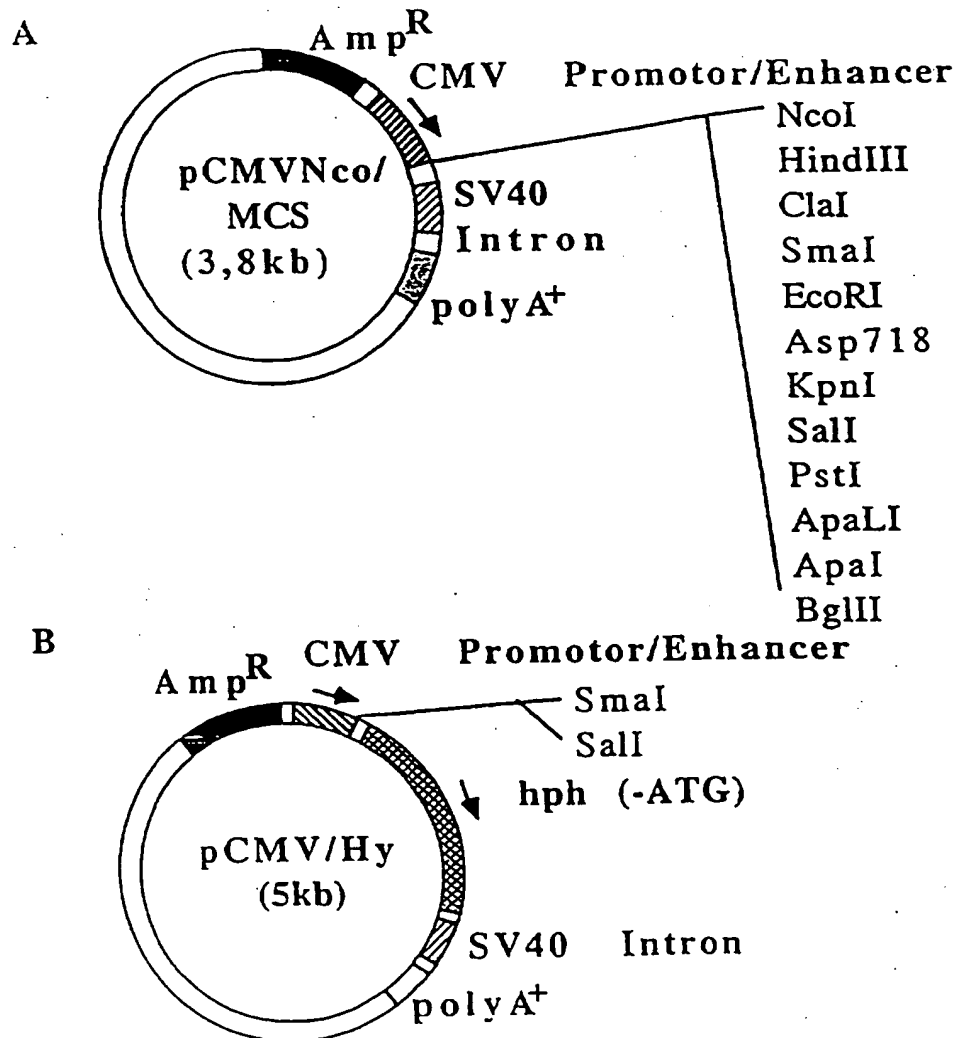


Fig.3

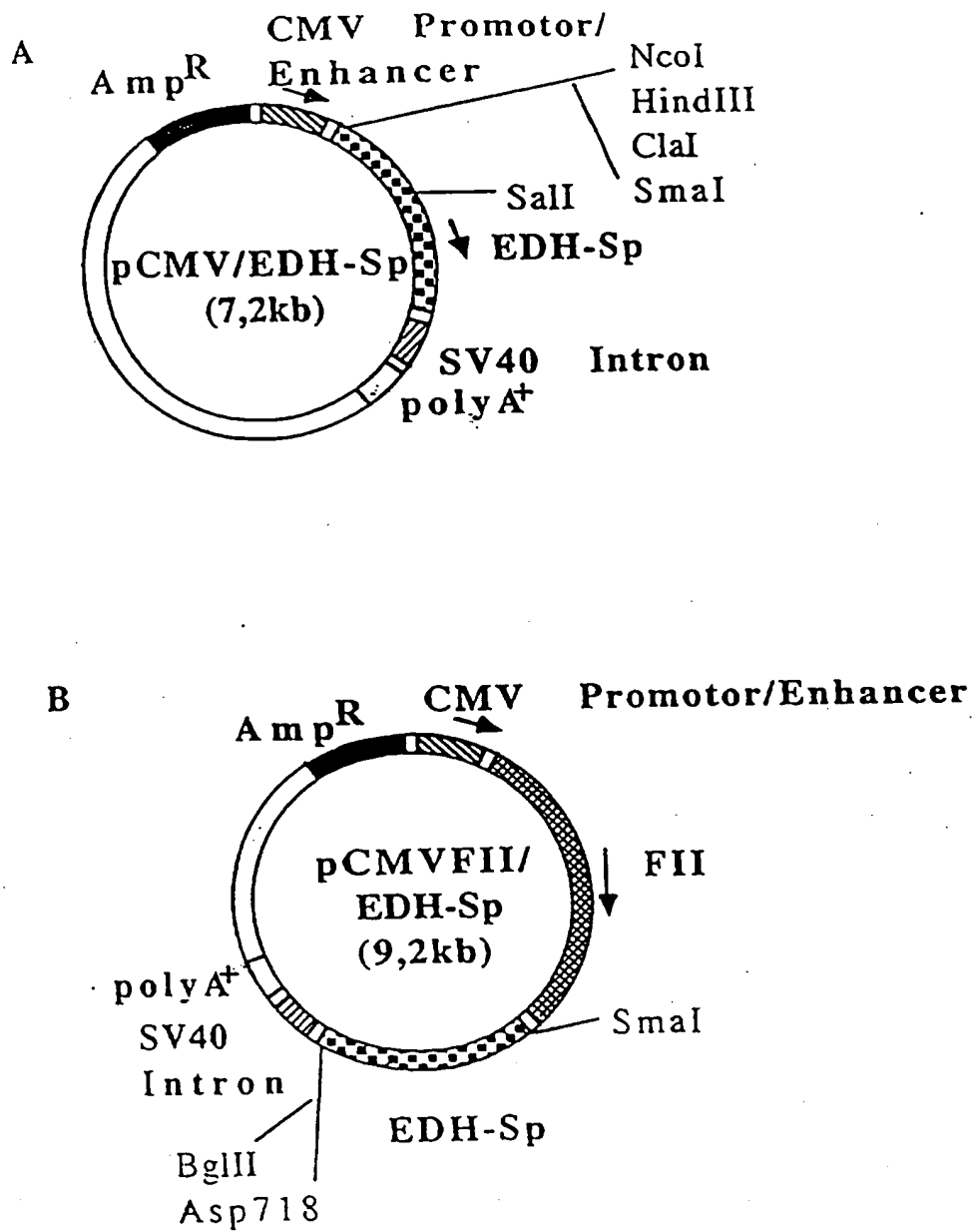


Fig. 4

MVRPLNCIVA VSQNMGIGKN GDLWPPLRN EFKYFORMTT TSSVEGKQNL
VIMGRKTWFS IPEKNRPLKD RINIVLSREL KEPPRGHFL AKSLDDALRL
IEQPELASKV DMWIVGGSS VYQEAMNQPQ HLRLFVTRIM QEFESDTFFP
EIDLGKYKLL PEYPGVLSEV QEEGKIYKF EVYEKKPELT ATSVEKFLIE
KFDSVSDLMQ LSEGEESRAF SFDVGGRGYV LRVNSCADGF YKDRYVYRHF
ASAALPIPEV LDIGEFSESL TYCISRAQG VTLQDLPETE LPAVLQPVAE
AMDAIAAADL SQTSGFGPFG PQGIGQYTTW RDFICAIADP HVYHWQTVMD
DTVSASVAQA LDELMLWAED CPEVRHLVHA DFGSNNVLTG NGRITAVIDW
SEAMFGDSQY EVANIFFWRP WLACMEQQTR YFERRHPELA GSPRLRAYML
RIGLDQLYQS LVDGNFDDAA WAQGRCDIV RSGAGTVGRT QIARRSAVW
TDGCVEVLAD SGNRRPSTRP RAKE

Fig. 5-A

MVRPLNCIVA VSQNMGIGKN GDLWPPLRN EFKYFQRM TT TSSVEGKQNL

VIMGRKTWFS IPEKNRPLKD RINIVLSREL KEPPRG AHFL AKSLDDALRL

IEQPELASKV DMVWIVGGSS VYQEAMNQPG HLRLFVTRIM QEFESDTFFP

EIDLGKYKLL PEYPGVLSEV QEEGKI KYF EVYEKKGRLR TGGGGGNRRI
Glycin Spacer

PPELTATSVE KELIEKFDSV SDLMQLSEGE ESRAFSFDVG GRGYVLRVNS

CADGFYKDRY VYRHFASAAL PIPEVLDIGE FSESLTYCIS RRAQGVTLQD

LPETELPAVL QPVAEAMDAI AAADLSQTSG FGPF GPQGIG QYTTWRDFIC

AIADPHVYHW QTMDDTVSA SVAQALDELM LWAEDCPEVR HLVHADFGSN

NVLTDNGRIT AVIDWSEAMF GDSQYEVANI FFWRPWLACM EQQTRYFERR

HPELAGSPRL RAYMLRIGLD QLYQSLVDGN FDDAAWAQGR CDAIVRSGAG

TVGRTQIARR SAAVWTDGCV EVLADSGNRR PSTRPRAKE

Fig. 5-B

MVRPLNCIVA VSQNMGIGKN GDLWPPLRN EFKYFQMTT TSSVEGKQNL
VIMGRKTWFS IPEKNRPLKD RINIVLSREL KEPPRGHFL AKSLDDALRL
IEQPELASKV DMVWIVGGSS VYQEAMNQP G HLRLFVTRIM QEFESDTFFP
EIDLGKYKLL PEYPGVLSEV QEEKGIKYKF EVYEKKGRFP PPPPVRNRRI
Prolin Spacer
PPELTATSVE KFLIEKFDSV SDLMQLSEGE ESRAFSFDVG GRGYVLRVNS
CADGFYKDRY VYRHFASAAL PIPEVLDIGE FSESLTYCIS RRAQGVTLQD
LPETELPAVL QPVAEAMDAI AAADLSQTSG FGPFQPGIG QYTTWRDFIC
AIADPHVYHW QTMDDTVSA SVAQALDELM LWAEDCPEVR HLVHADFGSN
NVLTDNGRIT AVIDWSEAMF GDSQYEVANI FFWRPWLACM EQQTRYFERR
HPELAGSPRL RAYMLRIGLD QLYQSLVDGN FDDAAWAQGR CDAIVRSGAG
TVGRTQIARR SAAVWTDGCV EVLADSGNRR PSTRPRAKE

Fig. 5-C

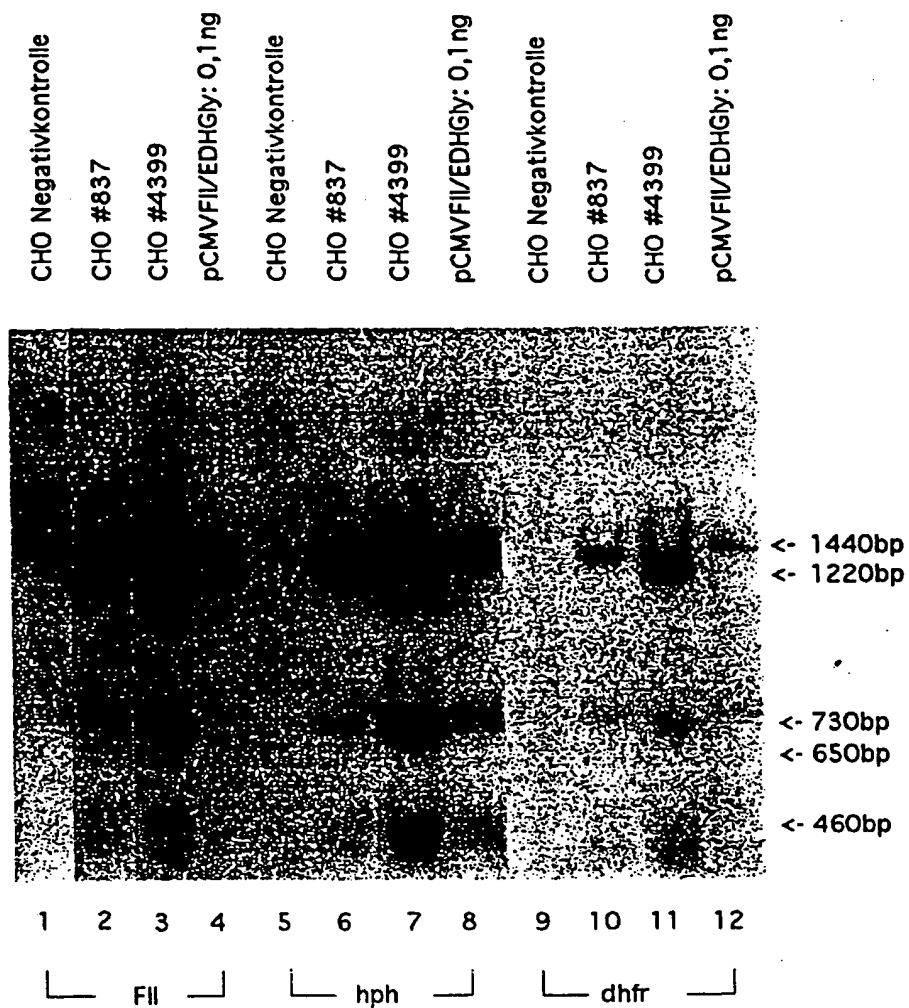


Fig. 6

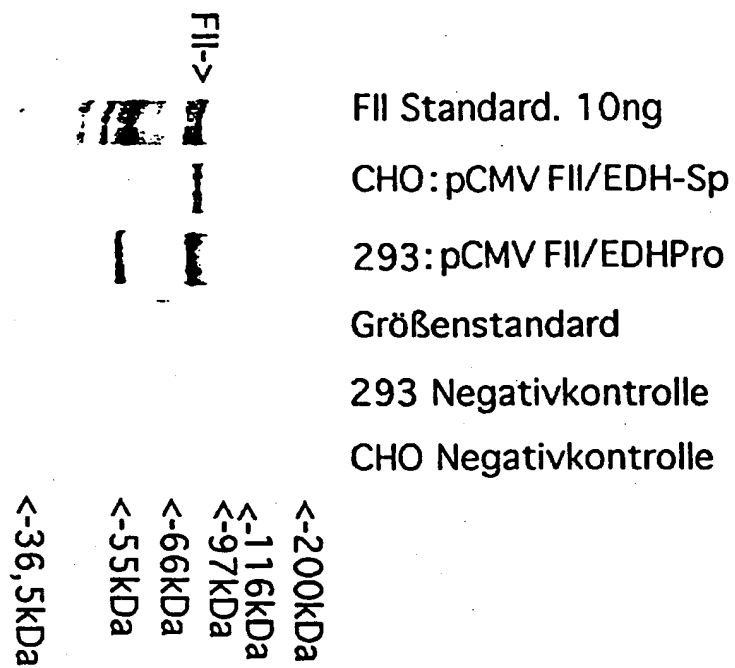


Fig. 7

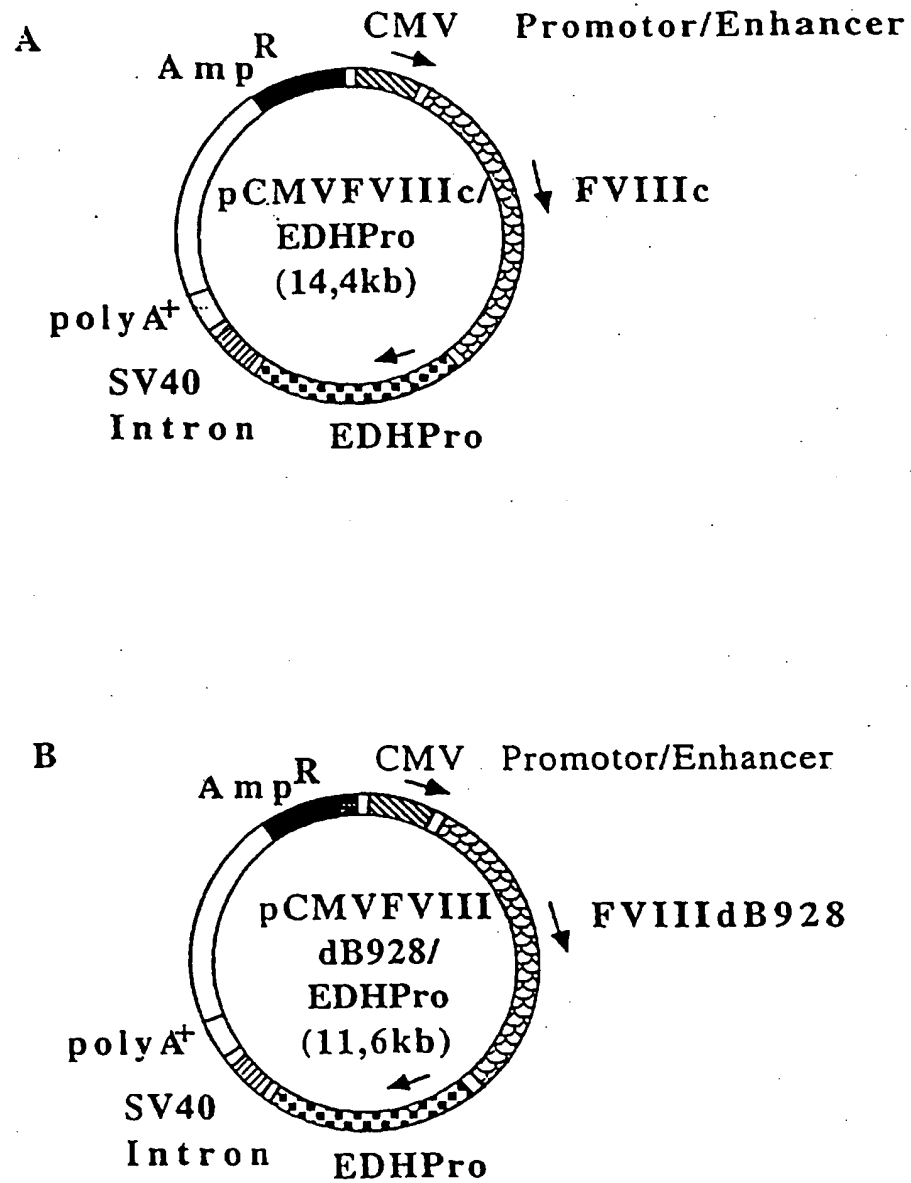


Fig. 8

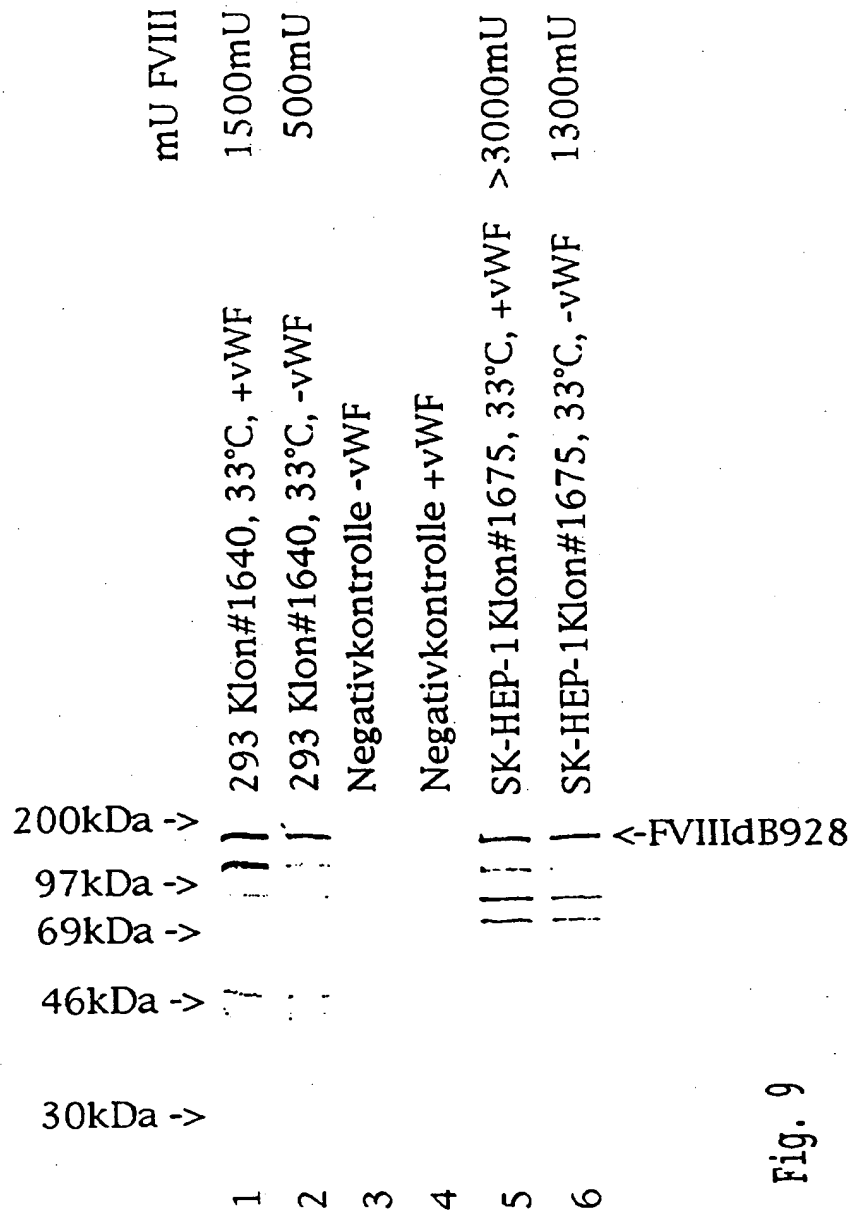


Fig. 9

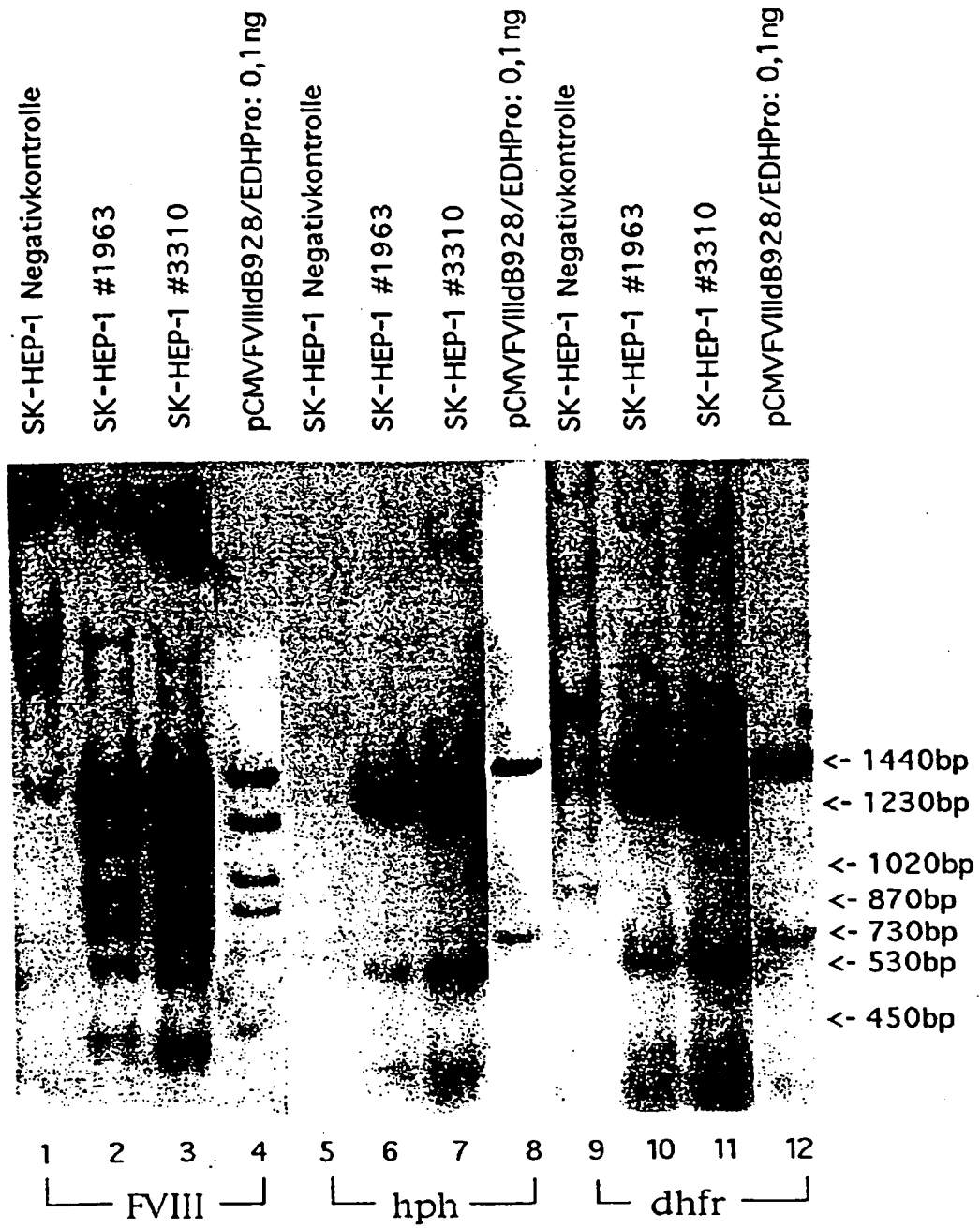


Fig. 10

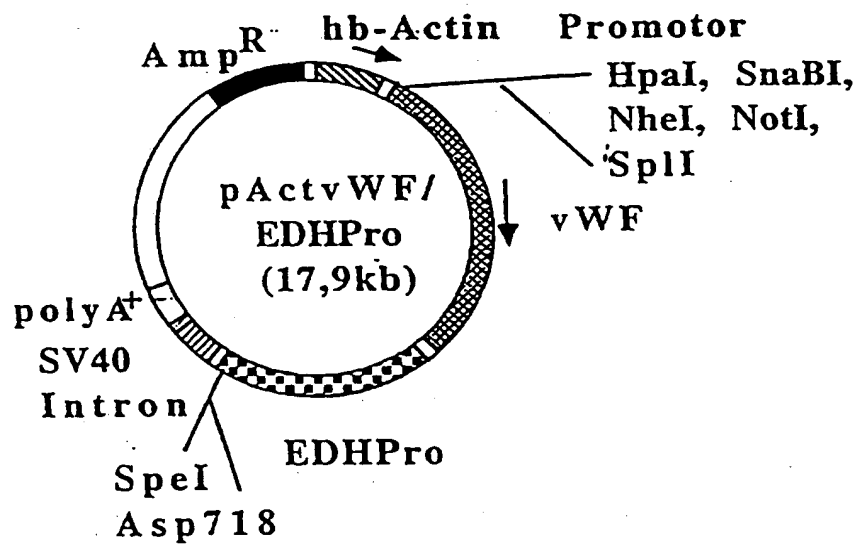


Fig.11

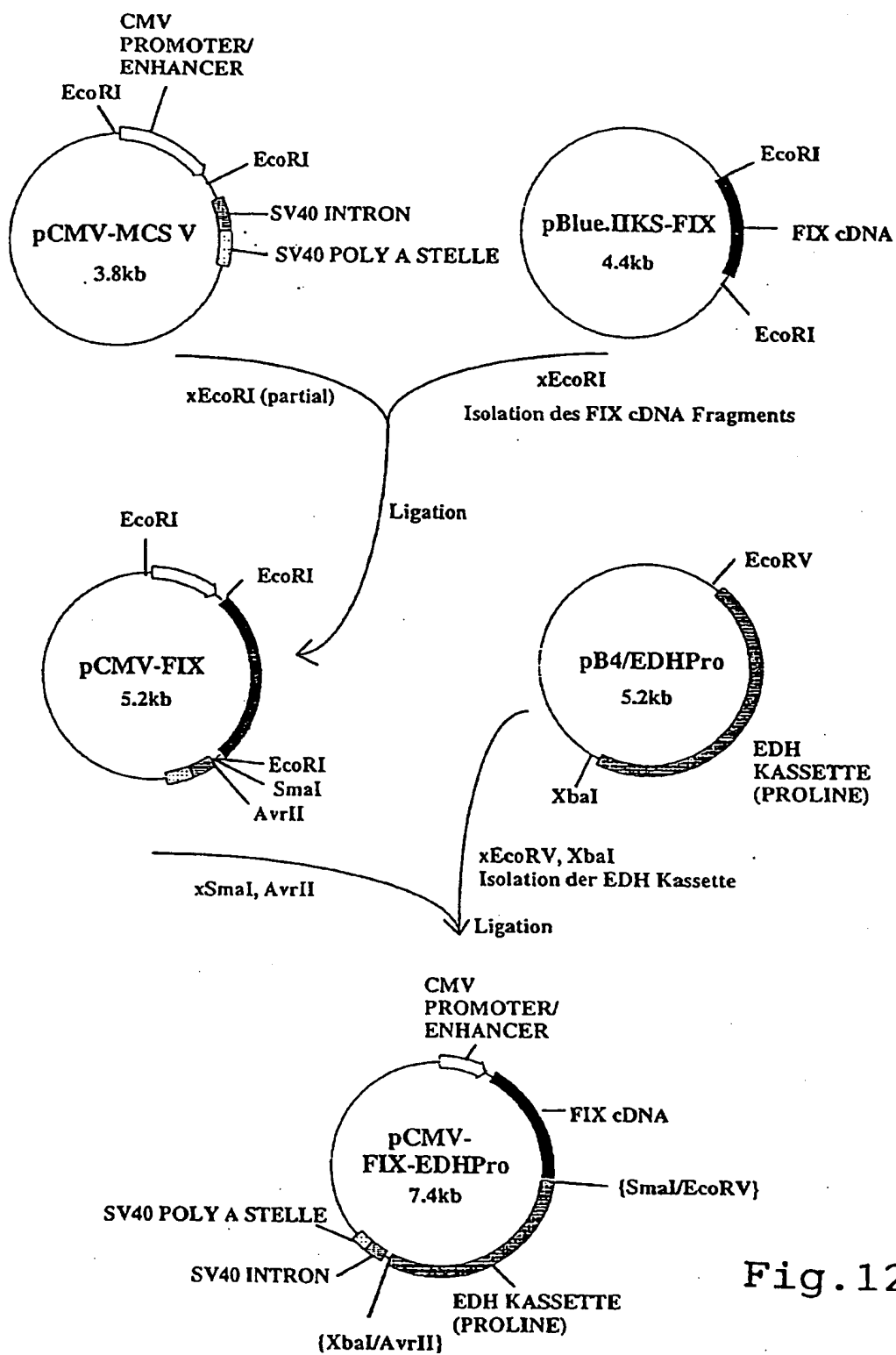


Fig.12

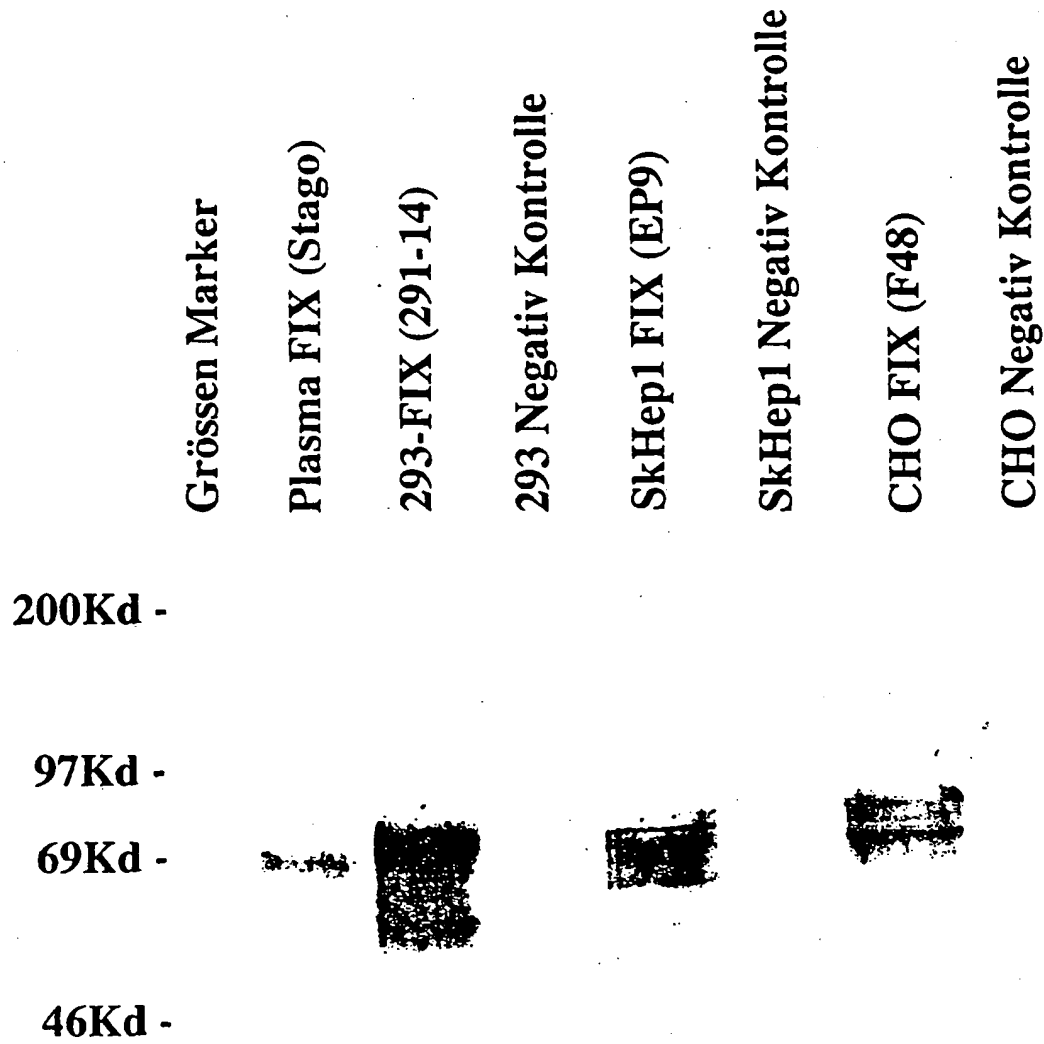


Fig. 13

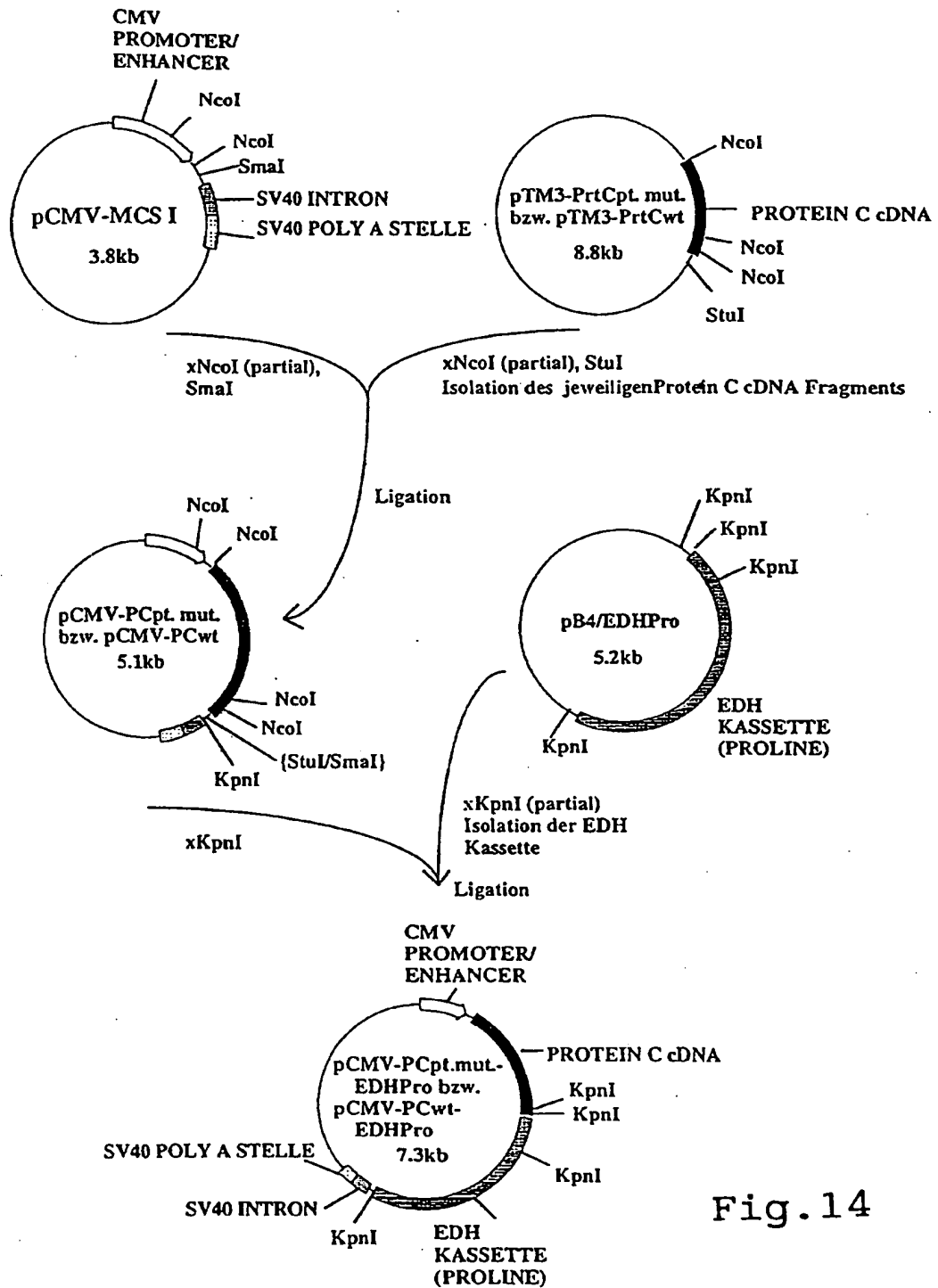


Fig.14

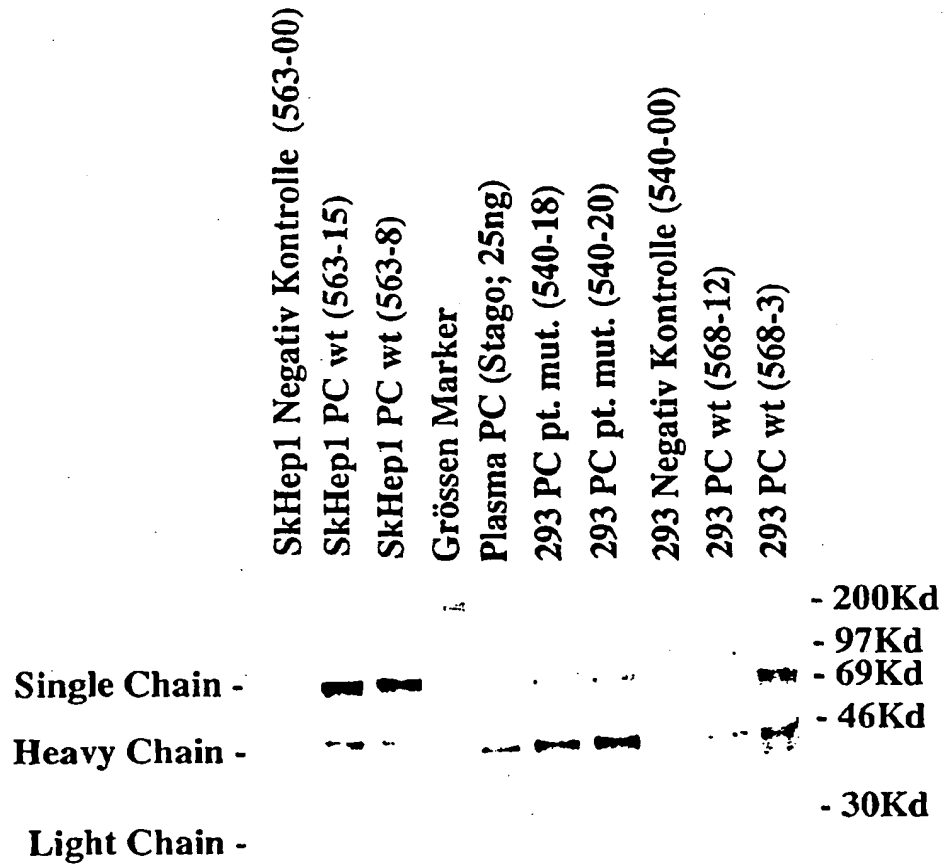


Fig. 15

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Sabine Herlitschka
(B) STRASSE: Budinskygasse 7/15
(C) ORT: Wien
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1190

(A) NAME: Uwe Schlokat
(B) STRASSE: Hauptstrasse 51
(C) ORT: Orth/Donau
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 2304

(A) NAME: Falko Guenther Falkner
(B) STRASSE: Neusiedlzeile 76A
(C) ORT: Orth/Donau
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 2304

(A) NAME: Friedrich Dorner
(B) STRASSE: Peterlinigasse 17
(C) ORT: Wien
(D) BUNDESLAND: Austria
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1238

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Selektion und Expression von
Fremdproteinen mittels eines Selektions-Amplifikations-System

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 28

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCACCCCCGC CTCCA

15

Fig. 16-A

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetic"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGAGCGGGG GTGGA

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 524 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met	Val	Arg	Pro	Leu	Asn	Cys	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Asn	Met	Gly	1	5	10	15
Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Asp	Leu	Pro	Trp	Pro	Pro	Leu	Arg	Asn	Glu	Phe	20	25	30	
Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Met	Thr	Thr	Thr	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Lys	Gln	35	40	45	
Asn	Leu	Val	Ile	Met	Gly	Arg	Lys	Thr	Trp	Phe	Ser	Ile	Pro	Glu	Lys	50	55	60	
Asn	Arg	Pro	Leu	Lys	Asp	Arg	Ile	Asn	Ile	Val	Leu	Ser	Arg	Glu	Leu	65	70	75	80
Lys	Glu	Pro	Pro	Arg	Gly	Ala	His	Phe	Leu	Ala	Lys	Ser	Leu	Asp	Asp	85	90	95	
Ala	Leu	Arg	Leu	Ile	Glu	Gln	Pro	Glu	Leu	Ala	Ser	Lys	Val	Asp	Met	100	105	110	
Val	Trp	Ile	Val	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Tyr	Gln	Glu	Ala	Met	Asn	Gln	115	120	125	
Pro	Gly	His	Leu	Arg	Leu	Phe	Val	Thr	Arg	Ile	Met	Gln	Glu	Phe	Glu	130	135	140	
Ser	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Glu	Ile	Asp	Leu	Gly	Lys	Tyr	Lys	Leu	Leu	145	150	155	160
Pro	Glu	Tyr	Pro	Gly	Val	Leu	Ser	Glu	Val	Gln	Glu	Glu	Lys	Gly	Ile	165	170	175	
Lys	Tyr	Lys	Phe	Glu	Val	Tyr	Glu	Lys	Lys	Pro	Glu	Leu	Thr	Ala	Thr	180	185	190	

Fig. 16-B

Ser Val Glu Lys Phe Leu Ile Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Asp Leu
 195 200 205
 Met Gln Leu Ser Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ala Phe Ser Phe Asp Val
 210 215 220
 Gly Gly Arg Gly Tyr Val Leu Arg Val Asn Ser Cys Ala Asp Gly Phe
 225 230 235 240
 Tyr Lys Asp Arg Tyr Val Tyr Arg His Phe Ala Ser Ala Ala Leu Pro
 245 250 255
 Ile Pro Glu Val Leu Asp Ile Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr
 260 265 270
 Cys Ile Ser Arg Arg Ala Gln Gly Val Thr Leu Gln Asp Leu Pro Glu
 275 280 285
 Thr Glu Leu Pro Ala Val Leu Gln Pro Val Ala Glu Ala Met Asp Ala
 290 295 300
 Ile Ala Ala Ala Asp Leu Ser Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly
 305 310 315 320
 Pro Gln Gly Ile Gly Gln Tyr Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala
 325 330 335
 Ile Ala Asp Pro His Val Tyr His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr
 340 345 350
 Val Ser Ala Ser Val Ala Gln Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala
 355 360 365
 Glu Asp Cys Pro Glu Val Arg His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser
 370 375 380
 Asn Asn Val Leu Thr Asp Asn Gly Arg Ile Thr Ala Val Ile Asp Trp
 385 390 395 400
 Ser Glu Ala Met Phe Gly Asp Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe
 405 410 415
 Phe Trp Arg Pro Trp Leu Ala Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe
 420 425 430
 Glu Arg Arg His Pro Glu Leu Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr
 435 440 445
 Met Leu Arg Ile Gly Leu Asp Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly
 450 455 460
 Asn Phe Asp Asp Ala Ala Trp Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val
 465 470 475 480
 Arg Ser Gly Ala Gly Thr Val Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser
 485 490 495
 Ala Ala Val Trp Thr Asp Gly Cys Val Glu Val Leu Ala Asp Ser Gly
 500 505 510
 Asn Arg Arg Pro Ser Thr Arg Pro Arg Ala Lys Glu
 515 520

Fig. 16-C

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 539 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide
- (B) LAGE: 192..196
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Glycin Spacer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

```

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1          5          10          15

Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
20          25          30

Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
35          40          45

Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50          55          60

Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
65          70          75          80

Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
85          90          95

Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
100          105          110

Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
115          120          125

Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
130          135          140

Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
145          150          155          160

Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165          170          175

Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Gly Arg Leu Arg Thr Gly
180          185          190

Gly Gly Gly Gly Asn Arg Arg Ile Pro Pro Glu Leu Thr Ala Thr Ser
195          200          205

Val Glu Lys Phe Leu Ile Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Asp Leu Met
210          215          220

Gln Leu Ser Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ala Phe Ser Phe Asp Val Gly
225          230          235          240

Gly Arg Gly Tyr Val Leu Arg Val Asn Ser Cys Ala Asp Gly Phe Tyr
245          250          255

```

Fig. 16-D

EP 0 711 835 A1

Lys Asp Arg Tyr Val Tyr Arg His Phe Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ile
 260 265 270
 Pro Glu Val Leu Asp Ile Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr Cys
 275 280 285
 Ile Ser Arg Arg Ala Gln Gly Val Thr Leu Gln Asp Leu Pro Glu Thr
 290 295 300
 Glu Leu Pro Ala Val Leu Gln Pro Val Ala Glu Ala Met Asp Ala Ile
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Asp Leu Ser Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly Pro
 325 330 335
 Gln Gly Ile Gly Gln Tyr Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala Ile
 340 345 350
 Ala Asp Pro His Val Tyr His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr Val
 355 360 365
 Ser Ala Ser Val Ala Gln Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala Glu
 370 375 380
 Asp Cys Pro Glu Val Arg His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser Asn
 385 390 395 400
 Asn Val Leu Thr Asp Asn Gly Arg Ile Thr Ala Val Ile Asp Trp Ser
 405 410 415
 Glu Ala Met Phe Gly Asp Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe Phe
 420 425 430
 Trp Arg Pro Trp Leu Ala Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe Glu
 435 440 445
 Arg Arg His Pro Glu Leu Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr Met
 450 455 460
 Leu Arg Ile Gly Leu Asp Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly Asn
 465 470 475 480
 Phe Asp Asp Ala Ala Trp Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val Arg
 485 490 495
 Ser Gly Ala Gly Thr Val Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser Ala
 500 505 510
 Ala Val Trp Thr Asp Gly Cys Val Glu Val Leu Ala Asp Ser Gly Asn
 515 520 525
 Arg Arg Pro Ser Thr Arg Pro Arg Ala Lys Glu
 530 535

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 539 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

Fig. 16-E

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide
 (B) LAGE:190..194
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/note= ""Prolin Spacer""

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

```

Met Val Arg Pro Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly
1           5           10           15
Ile Gly Lys Asn Gly Asp Leu Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Phe
          20           25           30
Lys Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln
          35           40           45
Asn Leu Val Ile Met Gly Arg Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys
50           55           60
Asn Arg Pro Leu Lys Asp Arg Ile Asn Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu
65           70           75           80
Lys Glu Pro Pro Arg Gly Ala His Phe Leu Ala Lys Ser Leu Asp Asp
          85           90           95
Ala Leu Arg Leu Ile Glu Gln Pro Glu Leu Ala Ser Lys Val Asp Met
100          105          110
Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Gln Glu Ala Met Asn Gln
115          120          125
Pro Gly His Leu Arg Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Glu Phe Glu
130          135          140
Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Gly Lys Tyr Lys Leu Leu
145          150          155          160
Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Glu Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile
165          170          175
Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Lys Gly Arg Phe Pro Pro Pro
180          185          190
Pro Pro Val Arg Asn Arg Arg Ile Pro Pro Glu Leu Thr Ala Thr Ser
195          200          205
Val Glu Lys Phe Leu Ile Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Asp Leu Met
210          215          220
Gln Leu Ser Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ala Phe Ser Phe Asp Val Gly
225          230          235          240
Gly Arg Gly Tyr Val Leu Arg Val Asn Ser Cys Ala Asp Gly Phe Tyr
245          250          255
Lys Asp Arg Tyr Val Tyr Arg His Phe Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ile
260          265          270
Pro Glu Val Leu Asp Ile Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr Cys
275          280          285
Ile Ser Arg Arg Ala Gln Gly Val Thr Leu Gln Asp Leu Pro Glu Thr
290          295          300
Glu Leu Pro Ala Val Leu Gln Pro Val Ala Glu Ala Met Asp Ala Ile
305          310          315          320

```

Fig. 16-F

Ala Ala Ala Asp Leu Ser Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly Pro
 325 330 335
 Gln Gly Ile Gly Gln Tyr Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala Ile
 340 345 350
 Ala Asp Pro His Val Tyr His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr Val
 355 360 365
 Ser Ala Ser Val Ala Gln Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala Glu
 370 375 380
 Asp Cys Pro Glu Val Arg His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser Asn
 385 390 395 400
 Asn Val Leu Thr Asp Asn Gly Arg Ile Thr Ala Val Ile Asp Trp Ser
 405 410 415
 Glu Ala Met Phe Gly Asp Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe Phe
 420 425 430
 Trp Arg Pro Trp Leu Ala Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe Glu
 435 440 445
 Arg Arg His Pro Glu Leu Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr Met
 450 455 460
 Leu Arg Ile Gly Leu Asp Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly Asn
 465 470 475 480
 Phe Asp Asp Ala Ala Trp Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val Arg
 485 490 495
 Ser Gly Ala Gly Thr Val Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser Ala
 500 505 510
 Ala Val Trp Thr Asp Gly Cys Val Glu Val Leu Ala Asp Ser Gly Asn
 515 520 525
 Arg Arg Pro Ser Thr Arg Pro Arg Ala Lys Glu
 530 535

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2079 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ACCATATTGC CGTCTTTTGG CAATGTGAGG GCCCGGAAAC CTGGCCCTGT CTTCTTGACG	60
AGCATTTCCTA GGGGTCTTTC CCCTCTCGCC AAAGGAATGC AAGGTCTGTT GAATGTCGTG	120
AAGGAAGCAG TTCCTCTGGA AGCTTCTTGA AGACAAACAA CGTCTGTAGC GACCCCTTGC	180
AGGCAGCGGA ACCCCCCACC TGGCGACAGG TGCCTCTGCG GCCAAAAGCC ACGTGATATA	240
GATACACCTG CAAAGGCGGC ACAACCCAG TGCACGTTG TGAGTTGGAT AGTTGTGGAA	300

Fig. 16-G

AGAGTCAAAT GGCTCTCCTC AAGCGTATTC AACAAAGGGGC TGAAGGATGC CCAGAAGGTA	360
CCCCATTGTA TGGGATCTGA TCTGGGGCCT CGGTGCACAT GCTTTACATG TGTTTAGTCG	420
AGGTTAAAAA ACGTCTAGGC CCCCCGAACC ACGGGGACGT GGTTCCTT TGAAAAACAC	480
GATAATACCA TGGTTCGACC ATTGAACTGC ATCGTCGCCG TGTCCCAAAA TATGGGGATT	540
GGCAAGAACG GAGACCTACC CTGGCCTCCG CTCAGGAACG AGTTCAAGTA CTTCCAAAGA	600
ATGACCACAA CCTCTTCAGT GGAAGGTAAA CAGAATCTGG TGATTATGGG TAGGAAAACC	660
TGGTTCCTCA TTCCTGAGAA GAATCGACCT TTAAAGGACA GAATTAATAT AGTTCTCAGT	720
AGAGAACTCA AAGAACCACC ACGAGGAGCT CATTTTCTTG CCAAAAGTTT GGATGATGCC	780
TTAAGACTTA TTGAACAACC GGAATTGGCA AGTAAAGTAG ACATGGTTTG GATAGTCGGA	840
GGCAGTCTG TTTACCAGGA AGCCATGAAT CAACCAGGCC ATCTCAGACT CTTTGTGACA	900
AGGATCATGC AGGAATTGTA AAGTGACACG TTTTCCCAG AAATTGATTT GGGGAAATAT	960
AAACTTCTCC CAGAATACCC AGGCGTCTC TCTGAGGTCC AGGAGGAAAA AGGCATCAAG	1020
TATAAGTTTG AAGTCTACGA GAAGAAAGGT CGACGGATCC CGCCTGAACT CACCGCGACG	1080
TCTGTCGAGA AGTTTCTGAT CGAAAAGTTC GACAGCGTCT CCGACCTGAT GCAGCTCTCG	1140
GAGGGCGAAG AATCTCGTGC TTTCAGCTTC GATGTAGGAG GCGGTGGATA TGTCTGCGG	1200
GTAAATAGCT GCGCCGATGG TTTCTACAAA GATCGTTATG TTTATCGGCA CTTTGCATCG	1260
GCCCGCTCC CGATTCCGGA AGTGCTTGAC ATTGGGGAAT TCAGCGAGAG CCTGACCTAT	1320
TGCATCTCCC GCCGTGCACA GGGTGTACG TTGCAAGACC TGCCTGAAAC CGAACTGCCC	1380
GCTGTTCTGC AGCCGGTCCG GGAGGCCATG GATGCGATCG CTGCGGCCGA TCTTAGCCAG	1440
ACGAGCGGGT TCGGCCCATT CGGACCGCAA GGAATCGGTC AATACACTAC ATGGCGTGAT	1500
TTCATATGCG CGATTGCTGA TCCCCATGTG TATCACTGGC AACTGTGAT GGACGACACC	1560
GTCAGTGCGT CCGTCGCGCA GGCTCTCGAT GAGCTGATGC TTTGGGCCGA GGAATGCCCC	1620
GAAGTCCGGC ACCTCGTGCA CGCGGATPCC GGCTCCAACA ATGTCCTGAC GGACAAATGGC	1680
CGCATAACAG CGGTCAATTGA CTGGAGCGAG GCGATGTTG GGGATTCCCA ATACGAGGTC	1740
GCCAACATCT TCTTCTGGAG GCCGTGGTTG GCTTGATAGG AGCAGCAGAC GCGCTACTTC	1800
GAGCGGAGGC ATCCGGAGCT TGCAGGATCG CCGCGGCTCC GGGCGTATAT GCTCCGCATT	1860
GGTCTTGACC AACTCTATCA GAGCTTGGTT GACGGCAATT TCGATGATGC AGCTTGGGCG	1920
CAGGGTCGAT GCGACGCAAT CGTCCGATCC GGAGCCGGGA CTGTCGGGCG TACACAAATC	1980
GCCCGCAGAA GCGCGGCCGT CTGGACCGAT GGCTGTGTAG AAGTACTCGC CGATAGTGGA	2040
AACCGACGCC CCAGCACTCG TCCGAGGGCA AAGGAATAG	2079

Fig. 16-H

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2109 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ACCATATTGC CGTCTTTTGG CAATGTGAGG GCCCGGAAAC CTGGCCCTGT CTTCTTGACG	60
AGCATTCCTA GGGGTCTTTC CCCTCTCGCC AAAGGAATGC AAGGTCTGTT GAATGTCGTG	120
AAGGAAGCAG TTCCTCTGGA AGCTTCTTGA AGACAAACAA CGTCTGTAGC GACCCTTTGC	180
AGGCAGCGGA ACCCCCCACC TGGCGACAGG TGCCTCTGCG GCCAAAAGCC ACGTGTATAA	240
GATACACCTG CAAAGGCGGC ACAACCCAG TGCCACGTTG TGAGTTGGAT AGTTGTGGAA	300
AGAGTCAAAT GGCTCTCCTC AAGCGTATTC AACAAGGGGC TGAAGGATGC CCAGAAGGTA	360
CCCCATTGTA TGGGATCTGA TCTGGGGCCT CGGTGCACAT GCTTTACATG TGTTTAGTCG	420
AGGTTAAAAA ACGTCTAGGC CCCCCGAACC ACGGGGACGT GGTTCCTT TGAAAAACAC	480
GATAATACCA TGGTTCGACC ATTGAACTGC ATCGTCGCCG TGTCCCAAAA TATGGGGATT	540
GGCAAGAACG GAGACCTACC CTGGCCTCCG CTCAGGAACG AGTTCAAGTA CTTCCAAAGA	600
ATGACCACAA CCTCTTCAGT GGAAGGTAAA CAGAATCTGG TGATTATGGG TAGGAAAACC	660
TGGTTCTCCA TTCCTGAGAA GAATCGACCT TTAAAGGACA GAATTAATAT AGTTCTCAGT	720
AGAGAACTCA AAGAACCACC ACGAGGAGCT CATTTTCTTG CCAAAAGTTT GGATGATGCC	780
TTAAGACTTA TTGAACAACC GGAATTGGCA AGTAAAGTAG ACATGGTTTG GATAGTCGGA	840
GGCAGTTCTG TTTACCAGGA AGCCATGAAT CAACCAGGCC ATCTCAGACT CTTGTGACA	900
AGGATCATGC AGGAATTGA AAGTGACAG TTTTCCAG AAATTGATTT GGGGAAATAT	960
AAACTTCTCC CAGAATACCC AGGCGTCCTC TCTGAGGTCC AGGAGGAAAA AGGCATCAAG	1020
TATAAGTTTG AAGTCTACGA GAAGAAAGGT CGATTACGTA CTGGAGGCGG GGGTGAAAT	1080
CGACGGATCC CGCTGAACT CACCGCGACG TCTGTCGAGA AGTTTCTGAT CGAAAAGTTC	1140
GACAGCGTCT CCGACCTGAT GCAGCTCTCG GAGGCGAAG AATCTCGTGC TTTCAGCTTC	1200
GATGTAGGAG GCGGTGGATA TGTCTGCGG GTAAATAGCT GCGCCGATGG TTTCTACAAA	1260
GATCGTTATG TTTATCGGCA CTTGTCATCG GCCGCGCTCC CGATTCCGGA AGTGCTTGAC	1320
ATTGGGGAAT TCAGCGAGAG CCTGACCTAT TGCATCTCCC GCCGTGCACA GGGTGTACG	1380
TTGCAAGACC TGCTGAAAC CGAACTGCCC GCTGTTCTGC AGCCGGTCGC GGAGGCCATG	1440
GATGCGATCG CTGCGGCCGA TCTTAGCCAG ACGAGCGGGT TCGGCCCAT TCGACCGCAA	1500
GGAATCGGTC AATACACTAC ATGGCGTGAT TTCATATGCG CGATTGCTGA TCCCCATGTG	1560
TATCACTGGC AAATGTGAT GGACGACACC GTCAGTGCGT CCGTCGCGCA GGCTCTCGAT	1620

Fig. 16-I

EP 0 711 835 A1

GAGCTGATGC TTTGGGCCGA GGACTGCCCC GAAGTCCGGC ACCTCGTGCA CGCGGATTTC	1680
GGCTCCAACA ATGTCTTGAC GGACAATGGC CGCATAACAG CGGTCAATTGA CTGGAGCGAG	1740
GCGATGTTTCG GGGATTCCCA ATACGAGGTC GCCAACATCT TCTTCTGGAG GCCGTGGTTG	1800
GCTTGATATGG AGCAGCAGAC GCGCTACTTC GAGCGGAGGC ATCCGGAGCT TGCAGGATCG	1860
CCGCGGCTCC GGGCGTATAT GCTCCGCATT GGTCTTGACC AACTCTATCA GAGCTTGGTT	1920
GACGGCAATT TCGATGATGC AGCTTGGGCG CAGGGTCGAT GCGACGCAAT CGTCCGATCC	1980
GGAGCCGGGA CTGTCCGGCG TACACAAATC GCCCGCAGAA GCGCGGCCGT CTGGACCGAT	2040
GGCTGTGTAG AAGTACTCGC CGATAGTGGA AACCGACGCC CCAGCACTCG TCCGAGGGCA	2100
AAGGAATAG	2109

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2109 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ACCATATATGC CGTCTTTTGG CAATGTGAGG GCCCGGAAAC CTGGCCCTGT CTTCTTGACG	60
AGCATTCTTA GGGGTCTTTC CCCTCTCGCC AAAGGAATGC AAGGTCTGTT GAATGTCGTG	120
AAGGAAGCAG TTCTCTTGGA AGCTTCTTGA AGACAAACAA CGTCTGTAGC GACCCCTTGC	180
AGGCAGCGGA ACCCCCCACC TGGCGACAGG TGCTCTGCG GCCAAAAGCC ACGTGTATAA	240
GATACACCTG CAAAGGCGGC ACAACCCAG TGCCACGTTG TGAGTTGGAT AGTTGTGGAA	300
AGAGTCAAAT GGCTCTCCTC AAGCGTATTC AACAAGGGGC TGAAGGATGC CCAGAAGGTA	360
CCCCATTGTA TGGGATCTGA TCTGGGGCCT CGGTGCACAT GCTTTACATG TGTTTAGTCG	420
AGGTTAAAAA ACGTCTAGGC CCCCCGAACC ACGGGGACGT GGTTCCTT TGAAAAACAC	480
GATAATACCA TGGTTCGACC ATTGAACTGC ATCGTCGCCG TGTCCAAAAA TATGGGGATT	540
GGCAAGAACG GAGACCTACC CTGGCCTCCG CTCAGGAACG AGTTCAAGTA CTTCAAAGA	600
ATGACCACAA CCTCTTCAGT GGAAGGTAAA CAGAATCTGG TGATTATGGG TAGGAAAACC	660
TGGTTCTCCA TTCCTGAGAA GAATCGACCT TTAAAGGACA GAATTAATAT AGTTCTCAGT	720
AGAGAACTCA AAGAACCACC ACGAGGAGCT CATTTTCTTG CCAAAAGTTT GGATGATGCC	780
TTAAGACTTA TTGAACAACC GGAATTGGCA AGTAAAGTAG ACATGGTTTG GATAGTCGGA	840
GGCAGTTCTG TTTACCAGGA AGCCATGAAT CAACCAGGCC ATCTCAGACT CTTGTGACA	900
AGGATCATGC AGGAATTGTA AAGTGACACG TTTTCCCAG AAATTGATTT GGGGAAATAT	960
AAACTTCTCC CAGAATACCC AGGCGTCCTC TCTGAGGTCC AGGAGGAAAA AGGCATCAAG	1020

Fig. 16-J

TATAAGTTTG AAGTCTACGA GAAGAAAGGT CGATTTCCAC CCCCCTCC AGTACGTAAT	1080
CGACGGATCC CGCTGAACT CACCGCGACG TCTGTCGAGA AGTTTCTGAT CGAAAAGTTC	1140
GACAGCGTCT CCGACCTGAT GCAGCTCTCG GAGGGCGAAG AATCTCGTGC TTTCAGCTTC	1200
GATGTAGGAG GGCCTGGATA TGTCTGCGG GTAAATAGCT GCGCCGATGG TTTCTACAAA	1260
GATCGTTATG TTTATCGCA CTTTGCATCG GCCGCGCTCC CGATTCCGGA AGTGCTTGAC	1320
ATTGGGAAT TCAGCGAGAG CCTGACCTAT TGCATCTCCC GCCGTGCACA GGGTGTACG	1380
TTGCAAGACC TGCCTGAAAC CGAACTGCCC GCTGTTCTGC AGCCGGTCGC GGAGGCCATG	1440
GATGCGATCG CTGCGGCCGA TCTTAGCCAG ACGAGCGGGT TCGGCCCATT CGGACCGCAA	1500
GGAATCGGTC AATACACTAC ATGGCGTGAT TTCATATGCG CGATTGCTGA TCCCCATGTG	1560
TATCACTGGC AAAGTGTGAT GGACGACACC GTCAGTGGT CCGTCGCGCA GGCTCTCGAT	1620
GAGCTGATGC TTTGGGCCGA GGACTGCCCC GAAGTCCGGC ACCTCGTGCA CGCGGATTTT	1680
GGCTCCAACA ATGTCTTGAC GGACAATGGC CGCATAACAG CGGTCATTGA CTGGAGCGAG	1740
GCGATGTTTG GGGATTCCCA ATACGAGGTC GCCAACATCT TCTTCTGGAG GCCGTGGTTG	1800
GCTTGTATGG AGCAGCAGAC GCGCTACTTC GAGCGGAGGC ATCCGAGCT TGCAGGATCG	1860
CCGCGGCTCC GGGCGTATAT GCTCCGCATT GGTCTTGACC AACTCTATCA GAGCTTGGTT	1920
GACGGCAATT TCGATGATGC AGCTTGGGCG CAGGGTCGAT GCGACGCAAT CGTCCGATCC	1980
GGAGCCGGGA CTGTCGGGCG TACACAAATC GCCCGCAGAA GCGCGGCCGT CTGGACCGAT	2040
GGCTGTGTAG AAGTACTCGC CGATAGTGA AACCGACGCC CCAGCACTCG TCCGAGGGCA	2100
AAGGAATAG	2109

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 81 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCGACCATGG ACAAGCTTAT CGATCCCGGG AATTCGGTAC CGTCGACCTG CAGGTGCACG	60
GGCCCAGATC TGACTGACTG A	81

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 81 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

Fig. 16-K

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:
- TCGATCAGTC AGTCAGATCT GGGCCCGTGC ACCTGCAGGT CGACGGTACC GAATTCCCGG 60
- GATCGATAAG CTTGTCCATG G 81
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 79 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:
- GGCCTAGGGC.CCTAGGCCTA CTAGTACTAA GCTTCTGCAG GTCGACTCTA GAGGACCCCG 60
- GGGAATTCAA TCGATGGCC 79
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:
- ACCCCCGGGG GTACCATATT GCCGTCTTTT GG 32
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:
- GGAATCCCA TGGTATTATC GTGTTTTTC 29

Fig. 16-L

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GGAAGCTTGG CCATGGTTCG ACCATTGAAC TGC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGTCAAGCTT TTCTTCTCGT AGACTTCAA CTTATACT

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

TCGATTACGT ACTGGAGGCG GGGGTGGAAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TCGATTTCCA CCCCCGCTC CAGTACGTAA

30

Fig. 16-M

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

GTCGATTACG TACTGGAGGC GGGGGTGGAA ATCGACGGAT CCC

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GTCGATTTC ACCCCCCGCCT CCAGTACGTA ATCGACGGAT CCC

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

GGAAATATGG CTTCTACACA CATGTGTTCC GCCTGAA

37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

TCCGTCTTG CCAATCCCCA TATTTTGGGA CACGGCG

37

Fig. 16-N

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 81 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

TCGATGTTAA CTACGTAGCT AGCGCGGCCG CCGTACGTCG CGAGTCGACA ATATTGATAT	60
CGGTACCGGT ACCACTAGTG T	81

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 79 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

CGACACTAGT GGTACCGGTA CCGATATCAA TATTGTCGAC TCGCGACGTA CGGCGGCCGC	60
GCTAGCTACG TAGTTAACA	79

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 79 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

TCGAATCGAT TGAATTC CCC GGGGTCCTCT AGAGTCGACC TGCAGAAGCT TAGTACTAGT	60
AGGCCTAGGG CCCTATCGA	79

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

Fig. 16-0

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:	
TGTGAGCTGC CCCATGGTGG AGGCACTGGC	30
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 57 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:	
GTGGAAGGAG GCGACCATGG GCCCCCCACT GTCGCCCTCG CAGGCATCCT GCCGGTC	57
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:	
GCAGTCGCAG CTGAAGCTGC CGAT	24
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 80 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:	
TCGACCATGG AAGCTTATCG ATCCCGGGAA TTCGGTACCG TCGACCTTGC AGGTGCACGG	60
GCCCGATCT GACTGATCGA	80

Fig. 16-P

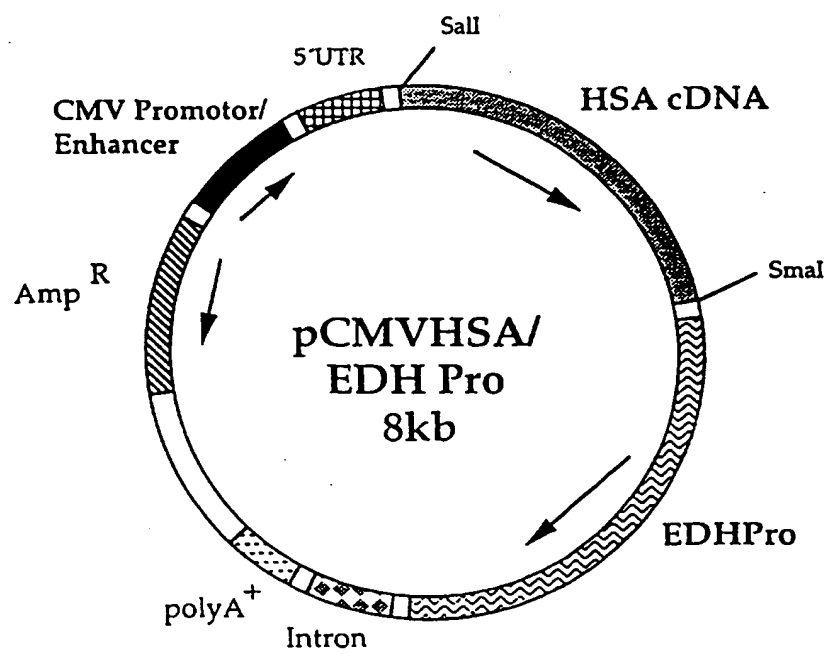


Fig. 17

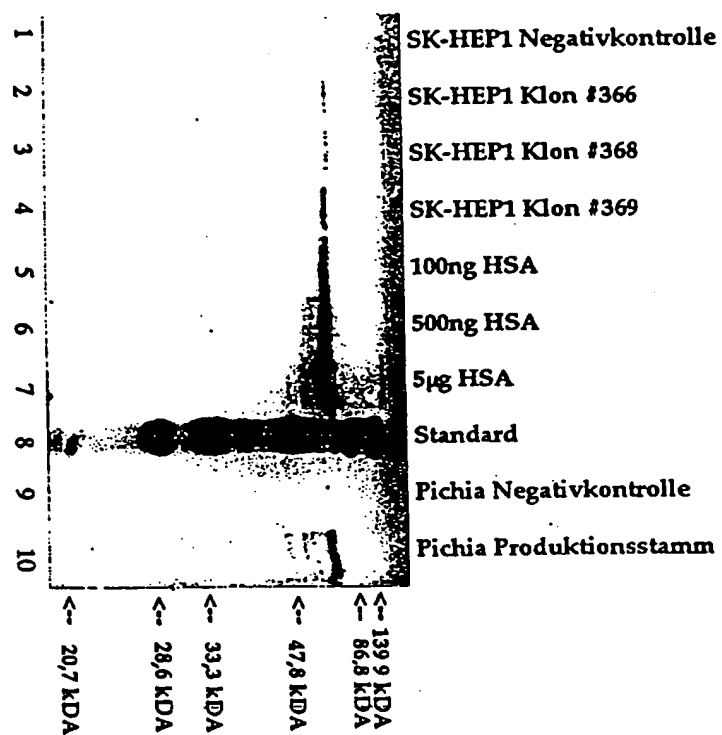


Fig. 18



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 89 0202

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	WO-A-90 01550 (ZYMOGENETICS INC) 22.Februar 1990 * Seite 14, Zeile 27 - Seite 15, Zeile 22 * * Seite 16, Zeile 3 - Seite 17, Zeile 18; Ansprüche 1-15 *	45-48, 50-52	C12N15/62 C12N15/65 C12N15/67 C12N15/85 C12N5/10 C12N9/64 C12N9/74
X	EP-A-0 294 910 (GIST BROCADES NV) 14.Dezember 1988 * das ganze Dokument *	45,49,53	C07K14/765 C07K14/755 A61K38/37 A61K38/43
D,X	J. BIOL. CHEM., Bd. 263, Nr. 13, 5.Mai 1988 AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US, Seiten 6352-6362, R.J. KAUFMAN ET AL. 'Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells' * das ganze Dokument *	45,48	
D,A	WO-A-94 24870 (BIOTRANSPLANT, INC.) 10.November 1994 * das ganze Dokument *	1-54	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
A	WO-A-94 05785 (BEIERSDORF AG ;BIOTECHNOLOG FORSCHUNG GMBH (DE); DIRKS WILHELM (DE) 17.März 1994 * das ganze Dokument *	1-54	C12N C07K A61K
-/--			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 19.Februar 1996	
		Prüfer Hornig, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p>		<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	

EPO FORM 120 (01/91) (P4/C03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 95 89 0202

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	BIOTECHNOLOGY, Bd. 12, Nr. 7, Juli 1994 NATURE PUBL. CO., NEW YORK, US, Seiten 694-698, Y. SUGIMOTO ET AL. 'Efficient expression of drug-selectable genes in retroviral vectors under control of an internal ribosome entry site' * das ganze Dokument *	1-54	
A	WO-A-93 03143 (ANDERSON, MORGAN, COUTURE) 18. Februar 1993 * das ganze Dokument *	1-54	
D,A	WO-A-92 08796 (IMMUNEX CORPORATION) 29. Mai 1992 * das ganze Dokument *	1-54	
A	FASEB JOURNAL, Bd. 4, Nr. 5, März 1990 FASEB, BATHESDA, MD, US, Seiten 1501-1507, U.A. GERMANN ET AL. 'Retroviral transfer of a chimeric multidrug resistance-adenosine deaminase gene' * das ganze Dokument *	1-54	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Recherchenort DEN HAAG		Abschließdatum der Recherche 19. Februar 1996	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 (12/12) (P0403)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.